

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Věra Křížová

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE BAKTERIÁLNÍHO
PROTEINU YddV (GLOBIN OBSAHUJÍCÍ KYSLÍKOVÝ
SENZOR S DIGUANYLÁT CYKLASOVOU AKTIVITOU)

Preparation and Characterization of a Bacterial Protein YddV, a
Globin-coupled Oxygen Sensor Diguanylate Cyclase

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného projektu podpořeného Univerzitou Karlovou v Praze UNCE_204025/2012 a GAČR P0301/10/0356.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 3. dubna 2012.

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce, RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D., za zadání zajímavého tématu a za kvalitní vedení. V neposlední řadě bych jí také ráda poděkovala za cenné rady, čas strávený při přípravě mé bakalářské práce a za trpělivost, se kterou se mi po celou dobu věnovala.

Abstrakt

Hemoproteiny jsou velmi důležité pro správnou funkci organismů, ať už se jedná o prokaryota nebo eukaryota. Mezi ty nejznámější se řadí myoglobin, hemoglobin, různé peroxidasy nebo cytochromy. Nově byla tato skupina proteinů rozšířena o hem obsahující senzorové proteiny. Jedná se o proteiny složené ze dvou domén. Senzorové, která je schopna detekovat signál (hem nebo plyn), a funkční, která je často enzymem nebo transkripčním faktorem. Aktivita funkční domény závisí na koncentraci signální molekuly, jejíž vazba na senzorovou doménu způsobuje změnu struktury této domény a následnou změnu struktury domény funkční.

Hem obsahující senzorové proteiny se dále dělí na hem detekující a plyn detekující proteiny. Hem detekující proteiny mají mnoho společných znaků, například vazbu hemu na thiolátový zbytek cysteinu, CP motiv atd.

Plyn detekující proteiny detekují molekulu plynu, nejčastěji se jedná o kyslík, oxid uhelnatý a oxid dusnatý.

V minulosti byla provedena řada studií zaměřených na hem obsahující senzorové proteiny, avšak stále není znám mechanismus přenosu signálu ze senzorové domény na funkční doménu.

Cílem této práce je literární shrnutí dosavadních poznatků o hem obsahujících senzorových proteinech se zaměřením na plyn detekující proteiny. V praktické části práce byl amplifikován a izolován plasmid kódujícího mutantní senzorovou doménu modelového kyslík detekujícího proteinu. Jako modelový protein byl zvolen globin obsahující kyslíkový senzor s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV). Konkrétně se jednalo o mutant senzorové domény YddV, který místo ⁶⁵Leu obsahoval Gln (pET-28a(+)/YddV-HD L65Q). Izolovaný plasmid byl charakterizován a následně byla ověřena jeho funkčnost expresí daného proteinu.

Klíčová slova: hem obsahující senzorové proteiny, hem detekující proteiny, plyn detekující proteiny, globin obsahující kyslíkový senzor s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV), izolace plasmidu, exprese proteinu

Abstract

Heme-containing proteins are very important for proper function of various organisms, both prokaryotic and eukaryotic. The most well-known ones are myoglobin, hemoglobin and various peroxidases and cytochromes. The group of heme-containing proteins was recently extended by a new type of proteins, which are called heme-containing sensor proteins. These proteins consist of two domains, sensor domain, which is able to detect a signal (either a molecule of heme or a molecule of gas), and functional domain, which is often an enzyme or a transcriptional factor. Activity of the functional domain depends on the concentration of signal molecule, which binds to the sensor domain, which then causes change of its structure. Consequently, change of structure of the sensor domain also leads to change of structure of the functional domain.

Heme-containing sensor proteins can be further divided into two smaller groups: heme sensor proteins and gas sensor proteins. Heme sensor proteins share a lot of features, for example binding of heme to a thiolate residue from cysteine, CP motif, etc.

Gas sensor proteins detect a molecule of gas, especially oxygen, carbon monoxide and nitrogen monoxide.

There have already been conducted various studies focusing on heme-containing sensor proteins, however, the mechanism of signal transfer from a sensor domain to a functional domain remains unknown.

Aims of this thesis are a summary of up-to-date known facts about heme-containing sensor proteins focusing on gas sensor proteins. In the practical part of this thesis plasmid DNA carrying information about mutant sensor domain of a model oxygen sensor protein was amplified and isolated. A gas sensor with diguanylate cyclase activity (YddV) has been chosen as the model protein. Specifically, the chosen model protein was a mutant sensor domain of YddV, which contained Gln instead of Leu at the position number 65 (pET-28a(+)/YddV-HD L65Q). Isolated plasmid DNA has been characterized and subsequently, its functionality has been proven.

Key words: heme-containing sensor proteins, heme sensor proteins, gas sensor proteins, a globin-coupled oxygen sensor with diguanylate cyclase activity (YddV), isolation of plasmid DNA, expression of protein

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Teoretický úvod.....	12
1.1. Hem.....	12
1.2. Vlastnosti a funkce hemoproteinů	13
1.3. Hem obsahující senzorové proteiny	14
1.4. Hem detekující proteiny.....	15
1.4.1. Přenos hemu	17
1.4.2. Příklady některých hem detekujících proteinů.....	18
1.4.2.1. Hemem regulovaný inhibitor (HRI)	18
1.4.2.2. Transkripční faktor regulující expresi genu pro hem oxygenasy (Bach1)	20
1.4.2.3. Neuronální PAS doménu obsahující protein 2 (NPAS2)	20
1.4.2.4. Cirkadiální rytmy regulující myši protein Period 2 (mPer2).....	21
1.5. Plyn detekující proteiny	21
1.5.1. Příklady některých plyn detekujících proteinů.....	23
1.5.1.1. Kyslík detekující protein s kinasovou aktivitou (FixL).....	23
1.5.1.2. Oxid uhelnatý detekující transkripční faktor (CooA).....	23
1.5.1.3. Globin obsahující histidin kinasa (AfGcHK).....	24
1.5.1.4. Rozpustná guanylát cyklasa (sGC).....	25
1.5.1.5. Kyslíkový senzor s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV).....	25
2. Cíle Práce.....	28
3. Materiál a metody	29
3.1. Použité přístroje	29
3.2. Použité chemikálie a materiály	30
3.2.1. Chemikálie	30
3.2.2. Materiály	32
3.2.2.1. Bakterie.....	32
3.2.2.2. Plasmid	32
3.2.2.3. Média	33
3.3. Metody	34
3.3.1. Příprava agarových ploten.....	34
3.3.2. Transformace <i>E. coli</i> DH5α	34
3.3.3. Transformace <i>E. coli</i> BL12(DE3)	34
3.3.4. Izolace plasmidu pET-28a(+).	35

3.3.4.1.	Složení použitých roztoků	35
3.3.4.2.	Postup izolace	35
3.3.5.	Kultivace bakterií a exprese proteinů	36
3.3.6.	Elektroforéza SDS-PAGE	37
3.3.6.1.	Složení použitých pufrů a roztoků	37
3.3.6.2.	Postup provedení elektroforézy	38
3.3.7.	Elektroforéza DNA	39
3.3.8.	Restrikční analýza	39
4.	Výsledky	40
4.1.	Izolace a charakterizace plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q	40
4.2.	Transforamce <i>E. coli</i> BL21(DE3) plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q	43
4.3.	Exprese YddV-HD L65Q v <i>E. coli</i> BL21(DE3)	43
5.	Diskuze	46
6.	Závěr	48
	Použitá literatura	49

Seznam zkratek

Názvy některých, v práci uvedených, proteinů a struktur nejsou v pravém slova smyslu zkratkou, spíše se jedná o akronym nebo krátký triviální název. Přesto v tomto seznamu zkratek uvádím také jejich výčet.

°C	stupeň celsia
A ₂₆₀	absorbance při 260 nm
A ₂₈₀	absorbance při 280 nm
AfGcHK	histidin kinasa obsahující globinovou strukturu izolovaná z <i>Anaeromyxobacter</i> sp., kmen Fw109-5 (kyslíkový senzor); zkratka z anglického názvu „globin-coupled histidin kinase“
Bach1	savčí transkripční faktor, který reguluje expresi hem oxygenasy v závislosti na koncentraci hemu a také helikasa na C-konci asociovaná s genem BRCA1
BMAL1	gen ovlivňující cirkadiální rytmus u savců; zkratka z anglického „brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like“
BRCA1	gen kódující protein zodpovědný za opravu DNA, jehož mutace je asociovaná se zvýšeným rizikem vzniku nádoru prsů; zkratka z anglického „breast cancer 1“
bp	páry bází; zkratka z anglického „base pairs“
c _g	hmotnostní koncentrace
c-di-GMP	cyklický diguanosin monofosfát
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CooA	CO detekující protein z fotosyntetizující bakterie <i>Rhodospirillum rubrum</i>
dsRNA	dvouvláknová RNA; zkratka z anglického „double-stranded RNA“
Ec DOS	O ₂ detekující protein s fosfodiesterasovou aktivitou
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eIF2 α	eukaryotický iniciační faktor 2 α kinasa; zkratka z anglického „eukaryotic initiation factor 2 α kinase“

FixL	O ₂ detekující protein zodpovědný za regulaci fixace vzdušného kyslíku
g	gram
GAF	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinu; akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „cGMP-specific phosphodiesterases“, „adenyl cyclases“ a „ <i>E. coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator“
GCN2	eukaryotický iniciační faktor 2 α s kinasovou aktivitou, který detekuje koncentraci aminokyselin v organismu; zkratka z anglického „general control nonrepressed 2“
GMP	guanosin monofosfát
GTE roztok	roztok používaný při izolaci plasmidu, obsahuje glukosu, Tris/HCl a EDTA
GTP	guanosin trifosfát
HRI	hemem regulovaný inhibitor; zkratka z anglického „heme-regulated inhibitor“
IPTG	isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid
kbp	kilo párů bází; zkratka z anglického „kilo base pairs“
l	litr
LB	Luria Broth
m	hmotnost
M	molární
mg	miligram
mg/ml	miligram na mililitr
ml	mililitr
mM	milimolární
mPer2	cirkadiální rytmy regulující myši protein Period 2; zkratka z anglického „mouse Period 2“
NEB pufr 4	pufr používaný při restriční analýze, 1x ředěný roztok obsahuje 50mM octan draselný, 20mM Tris/acetát, 10mM octan hořečnatý, 1mM dithiothreitol, pH 7,9; zkratka odvozena z názvu výrobce New England Biolabs

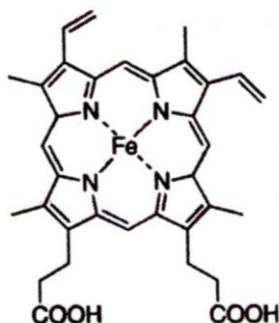
NPAS2	neuronální PAS doménu obsahující protein 2; zkratka z anglického „Neuronal PAS Protein 2“
OD ₆₀₀	optická densita měřená při vlnové délce 600 nm
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu; zkratka z anglického „polyacrylamid gel electrophoresis“
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinu; akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „ <i>Drosophila</i> period clock protein PER“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ARNT“, „ <i>Drosophila</i> single-minded protein SIM“
PEG	polyethylenglykol
PERK	eukaryotický iniciační faktor 2 α s kinasovou aktivitou nacházející se v endoplasmatickém retikulu
PRK	proteinová kinasa aktivovaná dsRNA
rpm	otáčky za minutu; zkratka z anglického „revolutions per minute“
RR	regulátor odpovědi; zkratka z anglického „response regulator“
SDS	dodecylsulfát sodný
sGC	rozpustná guanylát cyklasa
TAE pufr	pufr používaný při elektroforéze DNA, složení: Tris/acetát, EDTA
TB	Terrific Broth
TE pufr	pufr sloužící k uchovávání plasmidu v roztoku, složení: Tris/HCl, EDTA
TEMED	tetramethylethyldiamin
V	volt
YddV-HD	senzorová doména proteinu YddV, čili „YddV- heme domain“
YddV-HD L65Q	mutantní senzorová doména YddV, kdy je na pozici 65 místo leucinu glutamin
YddV-HD wt	senzorová doména YddV ve své přirozené podobě (tzv. „wild-type“)

μg	mikrogram
$\mu\text{g/ml}$	mikrogram na mililitr
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	mikrogram na mikrolitr
μl	mikrolitr

1. Teoretický úvod

1.1.Hem

Molekula hemu se skládá ze čtyř pyrolových molekul, které jsou uspořádány tak, aby tvořily kruh. Vzniklý kruh se nazývá porfyrin. Mají-li pyrolová jádra postranní řetězce, jedná se o protoporfyrin IX a koordinací iontu železa do jeho centra vzniká hem. (viz Obr. 1)¹.



Obr. 1 *Struktura hemu.* Iont železa je koordinován do centra protoporfyrinu IX, který se skládá ze čtyř pyrolových kruhů s postranními řetězci. (Převzato z 2)

Hem se tvoří ve všech tkáních savců, nejdůležitější je však tvorba hemu v játrech a kostní dřeni¹. Syntéza hemu probíhá částečně v mitochondrii, kde syntéza začíná a končí, a v cytosolu buňky. V mitochondrii spojením sukcinyl-CoA a glycinu vznikne δ -aminolevulová kyselina. Potom, již v cytosolu, dochází ke vzniku porfobilinogenu, který ve své molekule obsahuje pyrolový kruh. Z porfobilinogenu reakcí katalyzovanou uroporfyrinogen III kosynthasou vznikají uroporfyrinogen III nebo uroporfyrinogen I. Oba jsou dále dekarboxylovány uroporfyrinogen dekarboxylasou na koproporfyrinogen III a koproporfyrinogen I. Ty jsou dále koproporfyrinogen oxisadou oxidovány na protoporfyrinogen IX, který už vzniká zase v mitochondrii. Protoporfyrinogen IX je oxidován na protoporfyrin IX a z něj díky ferrochelatase vzniká hem. Poté je hem zabudován do proteinu za vzniku hemoglobinu, myoglobinu, cytochromů nebo jiných hem obsahujících proteinů².

Abnormality v syntéze hemu způsobují závažné zdravotní potíže - skupinu nemocí nazvanou porfyrie. Existuje několik druhů, které se liší podle toho, který z enzymů katalyzujících syntézu hemu je defektivní. Mezi ně patří například erythropoetická porfyrie, která je způsobena špatnou funkcí uroporfyrinogen III kosyntasy¹.

Při degradaci hemu dochází k oxidaci hemu hem oxygenasou za vzniku lineární molekuly složené ze čtyř pyrolových kruhů, která se nazývá biliverdin. Biliverdin je potom redukován na bilirubin. Bilirubin z celého těla je koncentrován v játrech v konjugované formě. Bilirubin je totiž nerozpustný a, aby mohl být transportován do jater, interaguje s albuminem. V játrech se konjuguje a stává se z něj bilirubin diglukuronid, který je součástí žluči a je vylučován do tlustého střeva. Tam je metabolizován střevní mikroflórou a jeho metabolity jsou zodpovědné za hnědou barvu stolice. Nemůže-li docházet ke konjugaci bilirubinu s albuminem nebo k vylučování bilirubinu, popřípadě jsou-li postižena játra, mluvíme o tzv. hyperbilirubinémii¹.

1.2.Vlastnosti a funkce hemoproteinů

Vlastnosti i funkce hemoproteinů jsou ovlivněny povahou interakce hemu s proteinovou částí. V mnoha případech je hem vázán koordinačně-kovalentní vazbou přes iont železa, popř. kovalentní vazbou přes postranní řetězce porfyrinu. Také pozice hemu vůči proteinové doméně má vliv jak na funkci, tak na vlastnosti. Hem může být zabudován hluboko do struktury proteinu, nebo naopak může být navázán na určitou oblast na povrchu proteinu².

Z hlediska jejich funkce, se dají hemoproteiny rozdělit do několika skupin. Do první skupiny bychom mohli zařadit hemoglobin a myoglobin, jejichž funkcí je přenos a ukládání kyslíku. Druhou skupinou jsou hemoproteiny zodpovědné za přenos elektronů v dýchacím řetězci. Tento přenos elektronů je zprostředkováván cytochromem c a cytochromem b₅. Třetí skupina je tvořena hemoproteiny provádějícími oxigenační reakce, například cytochromy P450 (cit. ³). Nově objevenou čtvrtou skupinou jsou hem obsahující sensorové proteiny, jejichž funkce je založena na vazbě molekul plynů, nebo molekul hemu^{2,4}. V prvních třech skupinách plní hem funkci katalytického nebo funkčního centra, zatímco v poslední skupině jsou funkční a/nebo katalytická centra minimálně dvě a jen na tvorbě jednoho se podílí hem⁵.

Hem obsahující sensorové proteiny se skládají ze dvou domén, domény sensorové, která obsahuje hem, a domény funkční, která má často enzymatickou aktivitu. Naváže-li se na sensorovou doménu molekula plynu, nebo samotný hem, dojde ke změně konformace sensorové domény a v důsledku toho se změní i konformace domény funkční. Díky této konformační změně funkční domény dojde k inhibici, nebo stimulaci procesu, který tato doména vykonává⁴. Signalizační proces není v případě mnoha hem obsahujících proteinů

stále objasněn a intenzivně se studuje⁵. Nicméně je jisté, že hem obsahující senzorové proteiny jsou velmi důležité pro regulaci mnohých fyziologických procesů v prokaryotických i eukaryotických organismech. Je-li pro senzorovou doménu signálem molekula plynu, která se koordinuje k hemu v této doméně, jedná se o plyn detekující proteiny. Je-li signálem sama molekula hemu, jde o tzv. hem detekující proteiny. Plyn detekující proteiny regulují například aktivity řady proteinových kinas, diguanylát cyklasy a různých transkripčních faktorů. Hem detekující proteiny regulují podobné procesy jako plyn detekující proteiny, například transkripční faktory nebo kinasy, a mimo jiné také regulují degradaci proteinů⁴. Oba dva druhy hem obsahujících senzorových proteinů pracují v závislosti na aktuální přítomné koncentraci molekul plynu nebo hemu².

1.3. Hem obsahující senzorové proteiny

Jak již bylo uvedeno, hem obsahující senzorové proteiny se dělí na hem detekující proteiny a plyn detekující proteiny (viz kapitola 1.2.). Signálem hem senzorových proteinů je molekula hemu a signálem plyn detekujících proteinů je molekula plynu, konkrétně kyslíku, oxidu uhelnatého nebo oxidu dusnatého².

Je-li v organismu dostatečně velká koncentrace hemu, hem reaguje se senzorovou doménou hem detekujícího proteinu. Po navázání hemu dojde ke změně struktury senzorové domény a to má za důsledek změnu konformace funkční domény. Následně dochází buď k inhibici, nebo naopak stimulaci procesu vykonávaného funkční doménou (viz Obr. 2). Například se může jednat o aktivitu proteinové kinasy, nebo schopnost vazby na DNA². Mezi hem detekující proteiny patří například hemem regulovaný inhibitor (HRI, viz kapitola 1.4.2.1.)¹¹, nebo savčí transkripční faktor, který reguluje expresi hem oxygenasy (Bach 1, viz kapitola 1.4.2.2.)¹³.

Hem detekující proteiny mají společné některé vlastnosti. Mezi ně patří například CP motiv, thiolát, coby místo vazby hemu, rychlost disociace hemu, podmíněnost charakteru vazby hemu v závislosti na oxidačním stavu železa nebo plastičnost a flexibilita těchto proteinů⁴.

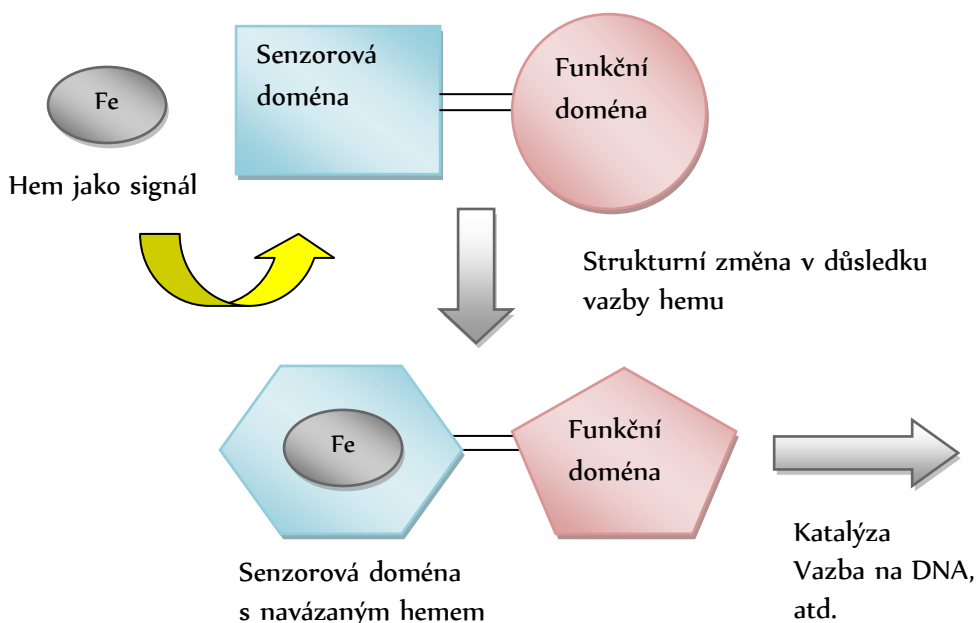
V případě plyn detekujících proteinů je mechanismus stejný s tím rozdílem, že se na hem v senzorové doméně koordinují molekuly plynu, jsou-li ve vysoké koncentraci. Mezi plyn detekující proteiny patří například globin obsahující kyslíkový senzor s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV, viz kapitola 1.5.1.5.)³⁰, globin obsahující histidin kinasa (A/GcHK, viz kapitola 1.5.1.3.)²⁷, nebo v neposlední řadě enzym, který je

zodpovědný za degradaci cyklického diguanosin monofosfátu (c-di-GMP) v závislosti na koncentraci kyslíku (Ec DOS)^{30,32}.

1.4.Hem detekující proteiny

Hem detekující proteiny mají několik společných vlastností. Ty nejdůležitější z nich jsou probrány v této kapitole.

U většiny hem detekujících proteinů funguje jako vazebné, a tedy sensorové, místo thiolátový postranní řetězec cysteinu. Mezi thiolátem a komplexem hemu, respektive iontem železa, v oxidované formě vznikají slabé interakce. Pro správnou funkci hem detekujících proteinů je totiž podstatná rychlost disociace hemového komplexu. Aby mohl protein správně fungovat, musí být interakce mezi hemem a proteinem relativně velmi slabá, aby mohlo docházet k rychlé disociaci signální molekuly hemu, a tak se mohla rychle modifikovat funkce sensorové domény. Nízká rychlost disociace by měla negativní vliv na regulativní funkci proteinu, a tím by mohly být ohroženy fyziologické pochody v těle organismu^{4,6,7}.



Obr. 2 Schéma funkce hem sensorových proteinů. Pokud je přítomen hem, naváže se na sensorovou doménu hem detekujícího proteinu a díky tomu dojde ke změnám ve struktuře funkční domény, a tím dochází ke změně její aktivity.(Schéma obrázku převzato z 4)

Thiolátový zbytek cysteinu využívají ke koordinaci i jiné hemoproteiny než právě popsané hem detekující proteiny. Mezi ně patří například oxid dusnatý detekující protein, který je transkripčním faktorem z bakterie *Rhodospirillum rubrum* (CooA, viz kapitola

1.5.1.2.)^{25,26}, nebo cytochrom P450, hemoprotein, který v mnoha organismech, mj. i v těle člověka, přispívá k degradaci xenobiotik⁴.

Slabé interakce oxidované formy hemu s thiolátem cysteinu umožňuje přítomnost prolinu, který je umístěn v proteinovém řetězci v sousedství cysteinu. Tento motiv se nazývá CP motiv^{4,6}. Bylo zjištěno, že mutace ⁴¹⁰Pro v sousedství ⁴⁰⁹Cys vede u proteinu HRI ke ztrátě schopnosti vázat hem. Z toho plyne, že Pro zbytek vedle Cys v CP motivu usnadňuje a moduluje koordinaci thiolátu k Fe(III) hemovému komplexu v tomto hem detekujícím proteinu⁸.

Některé hem detekující proteiny mají CP motivů více, jako například HRI (viz kapitola 1.4.2.1.), který má CP motivy dva⁸. Nicméně existují i hem detekující proteiny, které CP motiv nemají, a přesto jsou schopny vázat hemový komplex na thiolát cysteinu a vykonávat detekční funkci^{4,6}.

Jak už bylo uvedeno, se záporným nábojem thiolátu snadněji interaguje oxidovaná forma, tj. Fe(III) forma hemu. Redukovaná forma je na druhou stranu thiolátem relativně odpuzována. Je-li na oxidované formě hemu navázán thiolát cysteinu, za určitých podmínek může dojít k redukci hemu vlivem redoxního stresu (například hypoxie)^{4,6}. Z redukované formy hemu poté cystein snadno disociuje a umožní tak jinému ligandu, například imidazolu z histidinu, interakci s hemem. Vazba hemu v redukované formě na histidin je silnější než vazba oxidované formy na cystein. Poměrně silné interakce redukované formy hemového komplexu s histidinem se sice dají snadno rozrušit změnou okolních podmínek, například teploty nebo pH, ale tím většinou také způsobíme denaturaci funkční domény⁶. Tento jev se nazývá výměna ligandů hemu v důsledku změny redoxního stavu hemu a může mít za následek změnu 3D struktury sensorové domény, a to může být dalším (dostatečným) signálem schopným stimulovat, nebo inhibovat aktivitu funkční domény⁴.

Struktura molekul hem detekujících proteinů je typicky flexibilní na rozdíl od klasických hemoproteinů (viz kapitola 1.2.)^{4,8}. Je prokázáno, že jeden protein může mít mnoho konformačních stavů jednotlivých domén a ještě více vzájemných orientací jednotlivých domén vůči sobě⁵. V molekule HRI (viz kapitola 1.4.2.1.), modelovém hem detekujícím proteinu, byl identifikován ¹²⁰His jako jeden axiální ligand hemu a ⁴⁰⁹Cys jako druhý axiální ligand hemu⁸. Je zajímavé a pro hem detekující proteiny unikátní, že His se nachází na sensorové doméně, zatímco Cys je lokalizován na funkční doméně. Intramolekulární interakce mezi izolovanou sensorovou a funkční doménou je možné detekovat pouze za přítomnosti hemu, což naznačuje, že kofaktor zprostředkovává

intramolekulární interakci protein-protein díky hemem indukovaným změnami v globální struktuře proteinu².

Důkazem flexibility mohou být také experimenty s mutanty hem detekujících proteinů. Jediná mutace v místě vazby ligandu díky flexibilitě proteinu nezmění vlastnosti mutantního proteinu oproti proteinu ve své přirozené formě (tzv. „wild type“). Měřením spekter mutantních proteinů HRI (viz kapitola 1.4.2.1.) s mutací na pozicích ¹¹⁹His/¹²⁰His bylo zjištěno, že dochází k výměně ligandů hemu za další nejbližší His⁸.

1.4.1. Přenos hemu

Některé patogenní bakterie mají schopnost přenosu hemu. Díky přenosu hemu z erytrocytů hostitele do svého těla získávají železo potřebné k jejich výživě. Tento proces je velmi rychlý a nevyužívá thiolátu cysteinu jako vazného místa hemu. Místo thiolátu jsou využívány jiné ligandy, například imidazol z histidinu, methionin nebo fenolát nacházející se v molekule tyrosinu⁶.

Bylo zjištěno, že přenos hemu je také podstatný pro regulaci hem senzorových proteinů, například těch zodpovědných za regulaci cirkadiálních rytmtů. Tato skutečnost byla prokázána experimenty s neuronálním proteinem obsahujícím PAS doménu (NPAS2, viz kapitola 1.4.2.3.)¹⁷ a cirkadiální rytmy regulujícím myším proteinem Period 2 (mPer2, viz kapitola 1.4.2.4.)⁷. Molekulárně-biologická studie naznačuje, že přenos hemu z NPAS2 na mPer2 je kritický pro eukaryotickou transkripční regulaci cirkadiálních rytmtů. Navíc k přenosu hemu z NPAS2 na mPer2 pravděpodobně dochází i nepřímo *in vitro*. Přesněji rozdíly mezi rovnovážnými disociačními konstantami pro Fe(III) hemový komplex mezi proteiny (NPAS2 a mPer2) určují přenos hemu z jednoho proteinu na druhý⁶.

Při experimentech bylo zjištěno, že přenosy hemu ovlivňující cirkadiální rytmy trvají v porovnání s přenosy hemu v patogenních bakteriích mnohem déle. Z toho Toru Shimizu a jeho tým usuzuje, že, pokud jsou přenosy hemu pomalé a nepřímé, musejí zprostředkovávat reakci přenosu hemu jiné proteiny, jako třeba chaperony hemu nebo hemové přenašeče⁶.

Přenos hemu může nastat také mezi dvěma různými hem detekujícími proteiny a je důležitý pro regulaci fyziologických dějů⁶.

1.4.2. Příklady některých hem detekujících proteinů

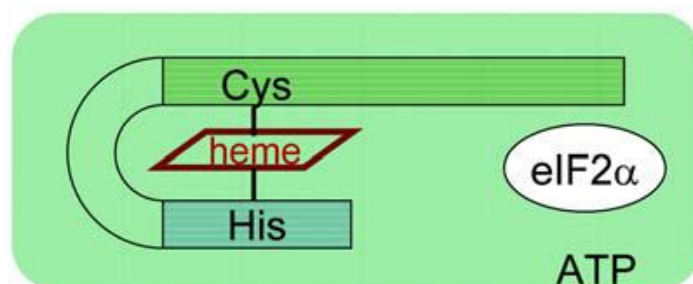
1.4.2.1. Hemem regulovaný inhibitor (HRI)

HRI neboli „heme-regulated inhibitor“ se také alternativním jménem nazývá hemem regulovaný eukaryotický iniciační faktor 2 α (eIF2 α) kinasa. HRI je hem detekující protein, který se nachází v nejen retikulocytech, což jsou nedozrálé erytrocyty, ale i v dalších tkáních těla, například v plicích. Řadí se mezi kinasy eukaryotických iniciačních faktorů, které inhibují translaci, je-li organismus ve stresu⁹. V případě HRI to znamená, že hraje velmi významnou roli při nedostatku hemu v retikulocytech. Mezi další eIF2 α kinasy patří eIF2 α kinasa regulující syntézu aminokyselin (GCN2), eIF2 α kinasa nacházející se v endoplasmatickém retikulu (PERK) a proteinová kinasa aktivovaná dsRNA (PKR), která je podobná PERK, a jejíž funkce je právě s PERK a endoplasmatickým retikulem spojena^{4,9,10,11}.

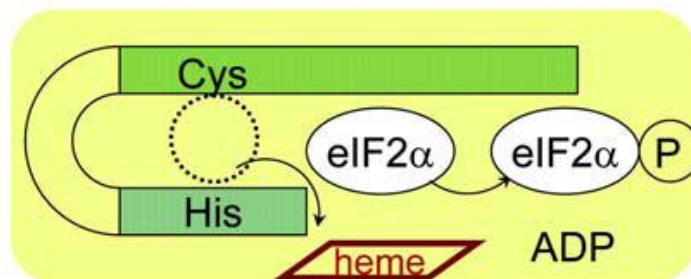
Za normálních okolností, tedy pokud je v retikulocyту dostatek hemu, je kinasa v HRI hemem inhibována a může probíhat syntéza hemoglobinu. Vazbou hemu dojde ke změně struktury sensorové domény, a tím dojde ke změně struktury i domény funkční, čímž se inhibuje eIF2 α kinasova aktivita funkční domény, a to má za následek inhibici syntézy proteinů. Je-li ale v retikulocyту hemu nedostatek, HRI není inhibován a kinasa obsažená v HRI fosforyluje eIF2 α na ⁵¹Ser a dojde k zastavení proteosyntézy obecně, a tedy i k zastavení syntézy hemoglobinu. Tak se zabrání tomu, aby retikulocyt vytvářel molekuly globinu v okamžiku, kdy není dostatek hemu. K tomuto jevu dochází například u pacientů trpících erytropoetickou protoporfyrií nebo β -thalasémií^{4,9,10,11}.

HRI má jedno vazebné místo pro hem, ale dva axiální ligandy. Jeden se nachází na sensorové doméně a druhý na funkční doméně^{6,11}. V přítomnosti hemu byly zjištěny interakce mezi oběma konci. HRI je tedy podle dostupných informací velmi flexibilní a při vysokých koncentracích hemu se jedna molekula hemu naváže jednou svou částí na vazebné místo na sensorové doméně a druhou částí na vazebné místo na funkční doméně (viz Obr. 3)^{2,6,11}. Jotaro Igarashi celý komplex popisuje jako lidskou ruku². Můžeme si přestavit celý protein jako lidské zápěstí, které je zaměstnáno detekováním hemu apozicí palce (sensorová doména) a ukazováčku (funkční doména)².

Inaktivní forma



Aktivní forma



Obr. 3 Mechanismus vazby hemu na HRI. Molekula HRI má jedno vazebné místo pro hem tvořené dvěma axiálními ligandy. Každý axiální ligand je v jiné doméně. Je-li hem navázán, HRI je neaktivní a může probíhat syntéza hemoglobinu. V opačném případě dochází k fosforylaci eIF2 α a syntéza hemoglobinu je inhibována. (Převzato z 2)

V roce 2004 Edward McEwen a jeho spolupracovníci prokázali, že je-li organismus podroben stresu v podobě molekul arseničitanu, HRI je schopen na tento stres reagovat inhibicí proteosyntézy⁹. Ve společné studii podporují myšlenku, že přidání arseničitanu aktivuje HRI, který začne fosforylovat eIF2 α a že fosforylace eIF2 α je důležitá pro zastavení proteosyntézy. Navíc z jejich studií vyplývá, že PERK, GCN2 a PKR významně nezprostředkovávají fosforylaci eIF2 α jako odpověď na arseničitan⁹.

Je prokázáno, že i jiné podněty mohou stimulovat aktivitu HRI, například tepelný šok, oxidativní stres nebo přítomnost NO. Jotaru Igarashimu a jeho kolegům se podařilo zjistit, že HRI konjugovaný s hemem může být aktivován molekulou NO, z čehož plyne, že HRI by mohl být i plyn detekující protein¹⁰. V této studii bylo použito nativní HRI pro stanovení kinasové aktivity a spektrální měření, jimiž bylo demonstrováno, že HRI je aktivován účinkem NO za vzniku pentakoordinovaného hem-NO komplexu, tj. komplexu hemu schopného disociovat z HRI¹⁰. NO je tímto efektem schopen zvrátit inhibiční efekt hemu na HRI⁵.

HRI je také nejspíš zodpovědný za vznik rakoviny plic¹². V roce 2007 byly provedeny studie, ve kterých bylo zjištěno, že pacienti trpící rakovinou plic mají v této tkáni vysokou koncentraci mutantního HRI¹².

1.4.2.2. Transkripční faktor regulující expresi genu pro hem oxygenasy (Bach1)

Bach1 je savčí transkripční faktor s helikasovou aktivitou, který zprostředkovává regulaci transkripce genu pro hem-oxygenasu, která je zodpovědná za degradaci hemu na biliverdin. Má-li organismus nedostatek hemu, Bach1 se naváže na DNA a tím inhibuje expresi hem-oxygenasy¹³.

Na druhou stranu, je-li hemu dostatek, naváže se na Bach1 a tím inhibuje jeho schopnost vazby na DNA. Díky tomu dojde k transkripci a posléze translaci genu hem oxygenasy a hem může být degradován^{13,14}.

Je možné, že se na Bach1 může navázat i více než jedna molekula hemu, jelikož je známo, že molekula Bach1 obsahuje šest CP motivů. Vědcům se ale stále nepodařilo potvrdit, zda se na Bach1 opravdu může vázat více molekul hemu¹⁵.

V poslední době se objevují studie, které potvrzují, že Bach1 hraje důležitou roli také při vzniku rakoviny prsu¹⁶. Bylo zjištěno, že pacienti s rakovinou prsu mají často mutace v genech kódujících právě Bach1. Bach1 se totiž váže také na gen, který kóduje protein zodpovědný za opravu DNA (BRCA1) a dojde-li k mutaci genu kódujícím strukturu Bach1, BRCA1 nemůže s Bach1 interagovat¹⁶. Vazba BRCA1 na Bach1 je důležitá pro funkci BRCA1. V tomto směru se interakce mezi BRCA1 a Bach1 zdá být nezbytnou pro normální opravu dvouřetězcových zlomů¹⁶.

1.4.2.3. Neuronální PAS doménu obsahující protein 2 (NPAS2)

NPAS2 je transkripční regulátor, který se nachází v předním mozku (prosencephalonu)¹⁷. Je složen ze tří podjednotek: základní helix-klička-helix doména a dvě hem-obsahující domény PAS-A a PAS-B^{6,18}.

Společně s jaderným translokátorem pro mozkový a svalový receptor pro aromatické uhlovodíky („brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator - like“) (BMAL1), což je jiný transkripční faktor, vytváří heterodimer. NPAS2-BMAL1 pak interaguje s E-box DNA, který je krátkým úsekem na DNA a který má vliv na expresi genů Per a Cry. Oba jsou transkripčními faktory, které mají podíl na regulaci cirkadiálních rytmů (viz kapitola 1.4.1.)⁶.

NPAS2 také funguje jako senzorový protein pro molekuly CO. Díky tomu by sice mohl být řazen i mezi plyn detekující proteiny, ale jeho všeobecné charakteristiky

odpovídají spíše hem detekujícím proteinům hlavně proto, že redukcí železitých iontů se mění axiální ligand hemu z cysteinu na histidin¹⁸.

1.4.2.4. Cirkadiální rytmy regulující myší protein Period 2 (mPer2)

Protein mPer2 patřící do skupiny hem detekujících proteinů je regulačním faktorem cirkadiálních rytmů (viz kapitola 1.4.1.)^{6,7}. Jeho funkce je stimulována dimerem vzniklým vazbou NPAS2 na BMAL1 (viz kapitola 1.4.2.3.). Působením zmíněného dimeru vzniká jiný dimer, ve kterém figuruje mPer2. Ten vytváří vazbu s proteinem Cry, což je složka transkripčního aparátu cirkadiální regulace, která je citlivá na světlo⁶.

V případě, že je hemu dostatek, dochází ke stabilizaci dimeru mPer2-Cry. Přítomnost Cry je nezbytně nutná pro zajištění správného fungování regulace, jinak totiž dochází k degradaci mPer2¹⁹.

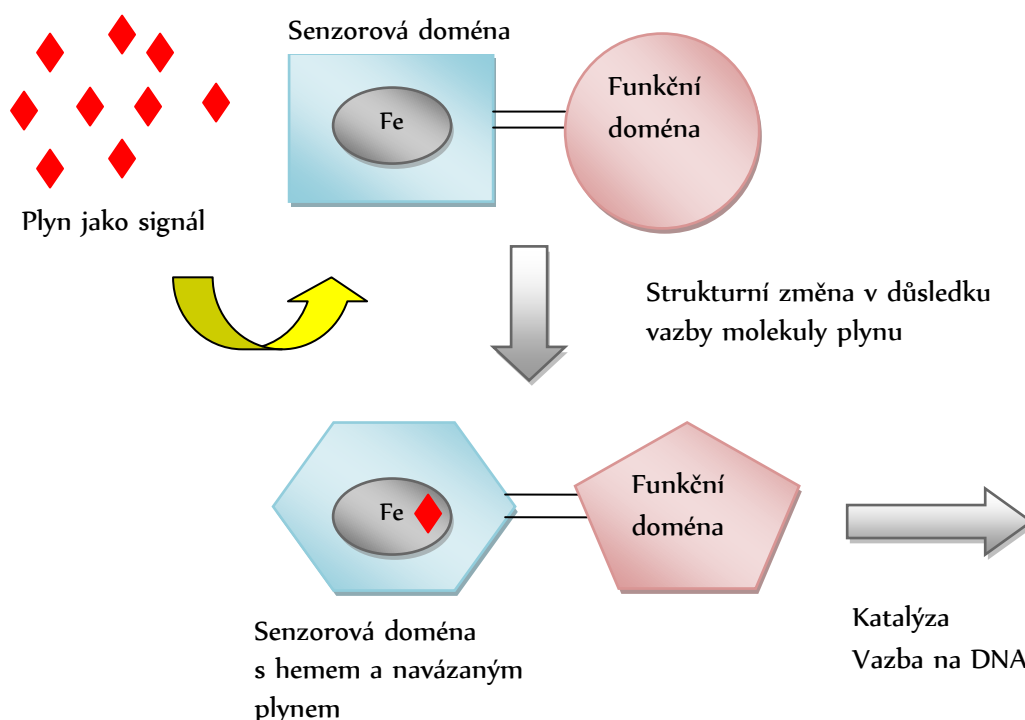
Jako u všech ostatních hem detekujících proteinů je vazebným místem hemu na mPer2 thiolátová skupina cysteinu. Specificky se na něj váže pouze hem obsahující oxidovanou formu železa⁶.

1.5. Plyn detekující proteiny

Plyn detekující proteiny jsou druhou podskupinou hem obsahujících senzorových proteinů. Jejich aktivita závisí na koncentraci detekovaného plynu v organismu. Zejména se jedná o kyslík, oxid dusnatý a oxid uhelnatý⁴. V poslední době se také začínají objevovat studie o plyn detekujících proteinech, jejichž aktivita závisí na koncentraci sirovodíku²⁰. Plyn detekující proteiny jsou stejně jako hem detekující proteiny složeny z funkční domény, obvykle s enzymovou aktivitou, a ze senzorové domény. Na senzorové doméně je na rozdíl od hem detekujících proteinů navázán hem relativně silnější interakcí, stejně jako v molekulách hemoglobinu a myoglobinu⁶.

Na N-terminální (senzorové) doméně se nachází hem, který funguje jako vazebné místo pro molekuly plynu. V případě, že je vysoká koncentrace plynu, dojde k jeho vazbě jako šestého ligandu hemu, a tím se změní struktura senzorové domény. Poté se signál přenesne na funkční doménu, která následkem přenosu signálu také změní svoji strukturu. Touto změnou je pak aktivita funkční domény buď stimulována, nebo naopak inhibována. Funkční domény plyn detekujících proteinů mohou mít různé druhy aktivit, např.

diguanylát cyklasovou aktivitu, kinasovou aktivitu nebo schopnost vazby na DNA. Funkční doména je obvykle na C-terminálním konci (viz Obr. 4)^{21,22}.



Obr. 4 Schéma funkce plyn detekujících proteinů. Na senzоровou doménu plynu detekujícího proteinu se váže molekula plynu, a tím způsobí v konečném důsledku změny ve struktuře funkční domény. To má za následek změnu aktivity této domény, ať už ve smyslu aktivace nebo inhibice. (Schéma obrázku převzato z 4)

Plyn detekující proteiny je možné rozdělit do skupin podle molekuly plynu, která s nimi interaguje a kterou tedy detekují, ale i podle dalších kritérií. Proteiny detekující kyslík se dle struktury senzоровé domény dělí do tří skupin. První skupinu tvoří ty, které mají jako senzоровé místo PAS doménu (strukturní motiv prostorového uspořádání proteinu; akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: „*Drosophila* period clock protein **PER**“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator **ARNT**“, „*Drosophila* single-minded protein **SIM**“) ²¹. Do této skupiny patří například plyn detekující protein s kinasovou aktivitou (FixL, viz kapitola 1.5.1.1.)²³ nebo protein prvně izolovaný z *E. coli*, který má fosfodiesterasovou aktivitu (Ec DOS)³². Další skupinou kyslík detekujících proteinů jsou globin obsahující plyn detekující proteiny. Mezi ně patří plyn detekující protein s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV, viz kapitola 1.5.1.5.)^{30,32}. Do třetí skupiny kyslík detekujících proteinů se řadí ty, které mají jako senzоровé místo GAF (doménu strukturní motiv prostorového uspořádání proteinu; akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento strukturní

motiv vyskytuje: „cGMP- specific phosphodiesterases“, „adenyl cyclases“ a „*E. coli* formate hydrogenlyase transcriptional activator“). Je to doména svou prostorovou strukturou podobná PAS, liší se od ní však aminokyselinovou sekvencí²².

Příkladem plyn detekujícího proteinu, který detekuje oxid uhelnatý, je například transkripční faktor izolovaný z fotosyntetizující bakterie *Rhodospirillum rubrum* (CooA, viz kapitola 1.5.1.2.)²⁵. Oxid dusnatý detekuje například rozpustná guanylát cyklasa (sGC, viz kapitola 1.5.1.4.)²⁸.

1.5.1. Příklady některých plyn detekujících proteinů

1.5.1.1. Kyslík detekující protein s kinasovou aktivitou (FixL)

FixL je kyslík detekující protein s kinasovou aktivitou funkční domény a PAS strukturou sensorové domény. Poprvé byl izolován z bakterie *Shinorhizobium meliloti*, což je bakterie, která je schopná fixovat plynný dusík v anaerobních podmínkách. Je-li v jejím okolí dostatek kyslíku, naváže se na sensorovou doménu FixL a transdukcí signálu na funkční doménu se inhibuje její aktivita. V anaerobních podmínkách FixL fosforyluje transkripční faktor FixJ, a tím dochází v konečném důsledku k expresi genů kódujících enzymy zodpovědné za fixaci dusíku a za následný anaerobní respirační cyklus²³.

Bylo zjištěno, že se na hem v sensorové doméně nemusí vázat jen kyslík, ale i jiné plyny. Také záleží na oxidačním čísle iontu železa v hemu. Aby došlo k inaktivaci kinasové aktivity FixL, je potřeba, aby ion železa byl v redukované formě. Vznikne tak komplex O₂-Fe(II). Dalšími inaktivními komplexy jsou ty, kde s oxidovanou formou iontu železa interaguje kyanid nebo imidazol. Naopak, kinasová aktivita není inhibována v případě, že je FixL bez ligandu, ať už je hem v oxidované nebo redukované formě a také pokud se na redukovanou formu hemu naváže oxid dusnatý nebo oxid uhelnatý²⁴.

1.5.1.2. Oxid uhelnatý detekující transkripční faktor (CooA)

V případě CooA se jedná o CO detekující protein, jehož funkční doména má funkci transkripčního faktoru. Byl izolován z bakterie *Rhodospirillum rubrum*, která patří mezi bakterie provádějící fotosyntézu²⁵. Fyziologicky se vyskytuje ve formě dimeru a oba monomery v komplexu se chovají analogicky k ostatním popsaným plyn detekujícím proteinům²⁶.

Oxid uhelnatý se váže na hem v obou sensorových doménách homodimeru, a tím aktivuje funkční doménu CooA, která je pak schopna vazby na DNA²⁶.

Pro transkripční faktor CooA je typická změna axiálního ligandu v závislosti na oxidačním čísle iontu železa v hemu. Je-li hem v oxidované formě, jsou axiálními ligandy cystein a prolin. Naopak, jde-li o redukovanou formu, jsou to histidin a prolin. Jedině komplex CO-Fe(II) je aktivní^{25,26}.

CooA je jediný hem obsahující sensorový protein, u něhož je známá celá nativní struktura na základě rentgenostrukturní analýzy, zatímco u ostatních hem obsahujících sensorových proteinů naznáme strukturu vůbec, případně známe pouze struktury jednotlivých domén⁵.

1.5.1.3. Globin obsahující histidin kinasa (AfGcHK)

Globin obsahující histidin kinasa (AfGcHK) je nedávno objevený kyslík detekující protein. Byl izolován z bakterie *Anaeromyxobacter* sp., kmen Fw109-5. Za přítomnosti kyslíku vykazuje autofosforylační aktivitu. Kromě komplexu Fe(II)-O₂ byla zjištěna aktivita i u komplexů Fe(II)-CO a Fe(III), zatímco Fe(II) bez ligandu aktivitu neprojevoval. Pro zachování správné funkce AfGcHK je důležitá nejen přítomnost správného ligandu a správného oxidačního stavu železa v hemu, ale také skutečnost, že protein tvoří v roztoku dimery²⁷.

Funkční doména AfGcHK je umístěna analogicky se všemi hem obsahujícími sensorovými proteiny na C-konci řetězce a sensorová doména je umístěna na N-konci. Předpokládá se, že ⁴⁵Tyr je vazebným místem molekuly kyslíku (distálním ligandem hemu) a interakcí s ním vytváří kyslík vodíkovou vazbu. Přítomnost tyrosinu je nezbytně nutná pro stabilitu Fe(II)-O₂ komplexu. Dále byl ¹⁸³His navrhnout jako místo autofosforylace, jelikož na mutantním proteinu, kde byl His vyměněn za Ala, k autofosforylaci nedocházelo²⁷.

Je-li AfGcHK fosforylován, dochází následně k přenosu fosfátové skupiny na protein dvoustupňového transdukčního systému tzv. regulátoru odpovědi („response regulator“, RR). Fosforylovaný RR je potom schopen regulovat různé fyziologické funkce bakteriální buňky, například tvorbu biofilmu nebo sporulaci²⁷. Detailní mechanismus se stále studuje a není dosud plně objasněn⁵.

1.5.1.4. Rozpustná guanylát cyklasa (sGC)

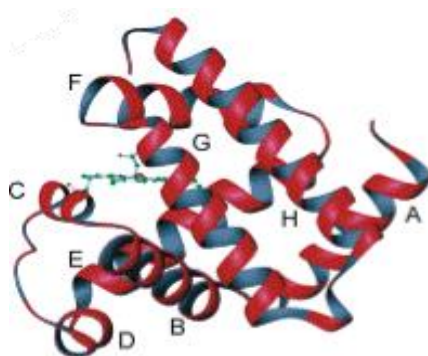
sGC je NO detekující protein s guanylát cyklasovou aktivitou. Je složen ze dvou podjednotek, které tvoří heterodimery. Ty jsou složené z α a β -řetězců. β -řetězec je významný pro detekční funkci, jelikož je na něm navázán hem²⁸.

Když se na redukovanou formu hemu v sGC naváže molekula oxidu dusnatého, dojde ke změně struktury proteinu, a tím se indukuje přeměna guanosin trifosfátu (GTP) na cyklický guanosin monofosfát (cGMP)^{28,29}. cGMP pak ovlivňuje další důležité fyziologické procesy v organismu.

S redukováným hemem sGC může také interagovat molekula oxidu uhelnatého, což má také za následek přeměnu GTP na cGMP. Na rozdíl od oxidu dusnatého má ale oxid uhelnatý nižší afinitu k sGC, takže se na něj přednostně váže NO^{28,29}.

1.5.1.5. Kyslíkový senzor s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV)

YddV je globin obsahující kyslík detekující protein s diguanylát cyklasovou aktivitou. Jeho název se odvozuje od jména sekvence DNA (genu yddv), která ho kóduje. Globinová část v YddV je homologní ke struktuře hemoglobinu a myoglobinu s tím rozdílem, že v senzorovém globinu chybí některé řetězce, které v hemoglobinu nebo myoglobinu jsou (viz Obr. 5)³⁰.



Obr. 5 *Savčí globin*. Oproti globinu obsaženému v kyslíkovém senzoru s diguanylát cyklasovou aktivitou (YddV) jako jeho senzorová doména, má savčí globin navíc řetězec D a řetězec C je odlišně natočený ke zbytku molekuly. Naopak v globinu YddV je navíc řetězec Z, který je kolmý na řetězce A. (Převzato z 31)

V závislosti na hladině kyslíku katalyzuje syntézu cyklického diguanylátmonofosfátu (c-di-GMP). c-di-GMP je velmi důležitý pro správnou funkci bakteriální buňky. Je to signální molekula („second messenger“), jejíž různé koncentrace v buňce mají vliv na tvorbu biofilmu, motilitu buněk nebo například na virulenci a

mezibuněčnou komunikaci. Mimo jiné bylo také objeveno, že nadměrná produkce YddV v buňce může vyvolat tvorbu extracelulárního polysacharidu poly-N-acetylglukosaminu^{32,33,34}.

Senzorovou doménu má také YddV umístěnou na N-konci a funkční na C-konci. Vazbou kyslíku na senzorovou doménu dojde ke stimulaci syntézy c-di-GMP. Antagonistou YddV je kyslík detekující protein zvaný Ec DOS s fosfodiesterasovou aktivitou, který je zodpovědný naopak za degradaci c-di-GMP^{30,32}.

Je známo, že YddV může interagovat i s jinými molekulami plynu za vzniku komplexů, z nichž některé jsou aktivní a některé inaktivní. Mezi aktivní formy patří oxidovaná forma hemu bez ligandu (Fe(III)) a redukované formy hemu s navázanou molekulou kyslíku (Fe(II)-O₂), nebo oxidu uhelnatého (Fe(II)-CO). Na druhou stranu, neaktivními formami jsou redukovaná forma bez ligandu (Fe(II)), a komplex redukované formy hemu s oxidem dusnatým (Fe(II)-NO)³⁰.

Zatím nebylo objeveno, jakou konformační změnu vyvolá vazba kyslíku na senzorovou doménu⁵. Není také známá přesná trojrozměrná struktura YddV, ale na základě poznatků o jiném globin obsahujícím kyslík detekujícím proteinu bylo usouzeno, že axiální ligand hemu na proximální straně YddV je ⁹⁸His a na distální straně ⁴³Tyr a ⁶⁰Gln (cit. ³⁰). Tyto dvě posledně jmenované aminokyseliny jsou v případě detekování kyslíku pro YddV velmi důležité. Nicméně provedením měření kinetických vlastností reakcí kyanidu s mutantními proteiny bylo Kenichim Kitanishim a jeho spolupracovníky zjištěno, že přítomnost ⁴³Tyr je nezbytně nutná pro rozpoznání molekuly kyslíku a pro udržení stability celého komplexu Fe(II)-O₂ (cit. ³⁰).

K tomu, aby byl YddV stabilní a mohl správně fungovat, je potřeba, aby rychlost autooxidace byla velmi nízká. Podle nejnovějších poznatků je za to zřejmě zodpovědný ⁶⁵Leu (cit. ³⁰). Tím, že zabraňuje molekule vody přiblížit se k vaznému místu, chrání celý protein před rychlou autooxidací. Kdyby se totiž molekula vody navázala na Fe(II)-hem komplex, došlo by ke zvýšení hydrofility detekčního místa v senzorové doméně, a to by způsobilo rychlou autooxidaci³⁰. K ověření této domněnky Kyosuke Nakajima a jeho spolupracovníci vytvořili mutanty YddV s různými aminokyselinami na místě ⁶⁵Leu (cit. ³²). Nepřítomnost ⁶⁵Leu dovoluje molekule vody vstoupit do prostředí Fe(III) hemu a koordinační struktura je tím přeměněna z pentakoordinovaného vysokospinového stavu do hexakoordinovaného vysokospinového stavu. pH-dependentní absorpční spektrální změny Fe(III) hemového komplexu YddV s touto hypotézou souhlasí³⁰.

Přítomnost ^{65}Leu je pro molekulu YddV stejně důležitá, jako přítomnost ^{43}Tyr . Oba se totiž podílejí na udržení stability a správné funkčnosti celé molekuly. Zatímco ^{43}Tyr je vazebným místem, ^{65}Leu je důležitý pro udržení pomalé autooxidace. Po prozkoumání mutantů bylo zjištěno, že se molekula vody může přiblížit vazebnému místu a stát se ligandem YddV³². Výsledky experimentů, které provedl Kyosuke Nakajima a jeho tým ukazují, že mutantní protein s methioninem na místě ^{65}Leu (L65M) zahrnuje směs pentakoordinovaných vysokospinových a hexakoordinovaných vysokospinových komplexů (s vodou jako axiálním ligandem), zatímco ostatní mutantní proteiny jsou hexakoordinované vysokospinové komplexy (s vodou jako axiálním ligandem) v oblasti neutrálního pH³⁰.

I přes již získaná data o YddV existuje celá řada nezodpovězených otázek ohledně struktury a funkce YddV, a proto je potřeba tento senzorový protein dále zkoumat. Stále nevíme, jak se po navázání signálu změní konformace senzorové domény a už vůbec nevíme, jak tato změna ovlivní strukturu funkční domény⁵.

Kromě experimentů s YddV ve své přirozené podobě (YddV-„full length“) se také provádějí experimenty pouze se senzorovou doménou YddV ve své přirozené podobě, čili „YddV-heme domain“ (YddV-HD) a jejími mutanty⁵.

2. Cíle Práce

1. Literární rešerše dosavadních poznatků o hem-obsahujících senzorových proteinech se zaměřením na kyslík detekující senzorové proteiny.
2. Amplifikace plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q kódující mutant senzorové domény bakteriálního proteinu YddV v *E. coli* DH5 α a následná izolace a charakterizace tohoto plasmidu.
3. Exprese genu neseného plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q v *E. coli* BL21(DE3).

3. Materiál a metody

3.1. Použité přístroje

Předvážky

EK-600H, A&D Instruments LTD

Analytické váhy

HM-200, A&D Instruments LTD

Centrifuga

Janetzki K70D, MLW

5415R, Eppendorf

Stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab

Allegro X-22R, Beckman Coulter

Spektrofotometr

Spekol 11, Carlzeiss, Jena

NanoVue Plus, GE Healthcare Bio-Sciences

Vodní lázeň

Julabo TW2, Biotech

Laminární box

BIO 126, Labox

Zdroj pro elektroforesu

EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech

Elektroforetická aparatura

miniVE Vertical, Amersham Biosciences

MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec

Bezdotykový kahan

Gasprofi2 SCS, VLD-TEC

Inkubátor

IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories

Třepačka

G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific co. Inc.

Orbi-Safe TS Net Wise, Gallenkamp

Autokláv

Varioklav 400E, H+P Labortechnik

Magnetická míchačka

mm7, Lavat

Vakuová sušička

DNA SpeedVac DNA 110, Savant

3.2. Použité chemikálie a materiály

3.2.1. Chemikálie

AppliChem, Německo

δ -aminolevulová kyselina

Ducheta Biochemie, Nizozemsko

kanamycin

Erba Lachema, ČR

Bromfenolová modř, ethanol, persíran amonný, kyselina octová, glukóza

Fermentas, Kanada

RNasa A, λ DNA/EcoRI + HindIII Marker, vzorkový pufr

Fluka, Švýcarsko

Akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), 2-merkaptoethanol, dodecylsulfát sodný (SDS)

Invitrogen, USA

SYBR Safe™ DNA Gel Stain

Lachema Brno, ČR

Dihydrofosrečnan draselný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), isopropanol, fenol, chloroform, isoamylalkohol

New England Biolabs, USA

Pufr 4, restrikční endonukleasy EcoRI a Nde I

Oxoid LTD, Velká Británie

Tryptone, Yeast Extract

Penta, ČR

Glycin, hydrogenfosforečnan didraselný, glycerol, hydroxid sodný, Tris/HCl, chlorid sodný, polyethylenglykol (PEG), agarosa, Tris/acetát

SERVA Electrophoresis

Coomasie Brilliant Blue R-250, tetramethylethyldiamin (TEMED), isopropyl β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Sigma-Aldrich, USA

LB agar

Thermo Scientific

Hmotnostní marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

3.2.2. Materiály

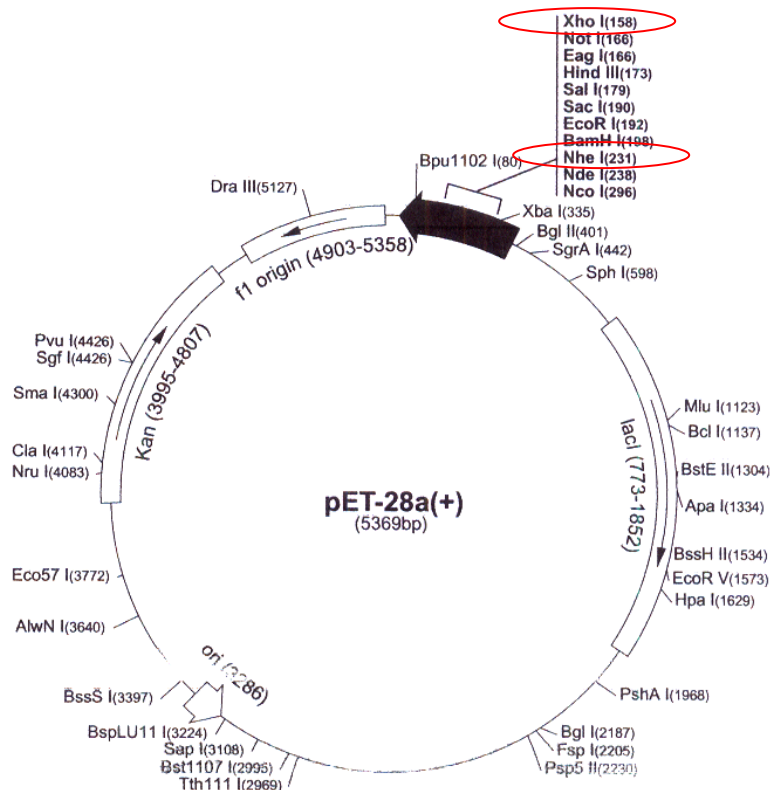
3.2.2.1. Bakterie

Pro amplifikaci plasmidu byly použity kompetentní bakterie *E. coli* DH5α a pro expresi proteinu *E. coli* BL21(DE3) od firmy Stratagene, USA.

3.2.2.2. Plasmid

Plasmid pET-28a(+)/YddV-HD L65Q byl laskavě poskytnut spolupracující laboratoří prof. Toru Shimizu, Univerzita Tohoku, Sendai, Japonsko.

Tento plasmid obsahuje gen pro protein, který je zodpovědný za resistenci bakterie vůči kanamycin. Na pozici 773-1852 se nachází Lac represor, jenž blokuje bez přidání induktoru (IPTG) produkci T7 RNA polymerasy. Po přidání induktoru dochází k produkci T7 polymerasy, která poté zprostředkovává expresi YddV-HD. Gen pro YddV-HD L65Q byl do tohoto plasmidu vložen pomocí restrikčních míst Xho I a BamH I. Obsahuje 466 párů bází (bp) a nese informaci o struktuře mutantního YddV-HD, konkrétně pro mutant L65Q. Celý plasmid pET-28a(+) obsahuje 5369 bp. Obrázek číslo 6 znázorňuje jeho mapu.



Obr. 6 Plasmid pET-28a(+). Restrikčními místy jsou BamH I a Xho I (červená elipsa). Na pozici 773-1852 se nachází Lac represor, jenž blokuje bez přidání induktoru (IPTG) produkci T7 RNA polymerasy. Na pozici 3999-4807 se nachází gen způsobující rezistenci vůči kanamycinu. (Převzato z 35)

Na obrázku číslo 7 je sekvence nukleotidů kódující YddV-HD ve své přirozené formě, tzv. YddV-HD wt.

CATATGGAGATGTATTTTAAAAGAATGAAAGATGAGTGGACCGGACTTGTGGAACAGGCAGATCCGCCCA
TTCGTGCTAAAGCCGCGGAAATTGCCGTTGCGCATGCTCATTATCTGAGTATCGAGTTTTATCGAATTGTC
CGCATCGACCCGCATGCCGAAGAATTCTTGAGTAATGAACAAGTTGAGCGGCAGTTGAAGAGTGCGATG
GAACGCTGGATTATTAACGTGCTTTCTGCCCAGGTTGACGATGTCGAAAGGCTAATACAAATCCAGCATA
CCGTCGCGGAAGTGCATGCCCGCATAGGAATTCGGGTAGAAATTGTCGAGATGGGGTTTCGGGTGCTGA
AAAAAATCCTCTATCCGGTGATCTTCTCTTCGGATTATTCCGCCGCAGAAAACTTCAGGTCTACCATTTTC
TCGATTAACAGTATTGATATCGCGATGGAAGTGATGACTCGCTAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGAC

Obr. 7 Sekvence nukleotidů kódujících YddV-HD wt proteinu. Červeně jsou vyznačena restrikční místa specifická pro Xho I a BamH I, která umožňují manipulaci s daným genem. Dále je zeleně vyznačen triplet nukleotidů kódujících ⁶⁵Leu, jelikož mutant na této pozici (Leu 65 Gln) byl předmětem našeho zájmu. (Převzato z 32)

3.2.2.3. Média

- TB médium

Nejprve bylo 48 g Tryptone a 92 g Yeast Extract rozpuštěno v 3,6 l destilované vody. Roztok lyzátu byl poté rozdělen odměrným válcem do osmi lahví po 450 ml, každá z nich byla překryta alobalovou zátkou a sterilizována.

Směs 9,2 g KH₂PO₄ a 50 g K₂HPO₄ se rozpouštěla v přibližně 200 ml destilované vody. Po rozpuštění bylo přidáno 32 ml 50% sterilního glycerolu a roztok byl doplněn na 400 ml. Jelikož roztok obsahoval nečistoty, byl filtrován. Získaný roztok byl následně sterilizován.

Po sterilizaci bylo k 450 ml roztoku lyzátu přidáno 50 ml roztoku fosfátů s glycerolem, aby výsledný objem média byl 500 ml. Toto médium bylo určeno k okamžitému použití.

- LB médium

V 1 l vody bylo rozpuštěno 10 g Tryptone, 5 g Yeast Extract a 10 g NaCl. Následovala sterilizace.

- LB agar

Ve 100 ml destilované vody byly rozpuštěny 4 g LB agaru a výsledný roztok byl poté sterilizován.

Všechna média byla sterilizována horkou párou při 121 °C po dobu 21 minut.

3.3. Metody

3.3.1. Příprava agarových ploten

Nejprve bylo potřeba rozpustit LB agar v mikrovlnné troubě. Když bylo médium dostatečně zchladlé, bylo převedeno přibližně 40 ml do sterilní zkumavky a bylo do něj přidáno 40 μ l kanamycinu (60 mg/ml). Takže výsledná koncentrace kanamycinu v LB agaru byla 60 μ g/ml. Výsledný roztok byl dobře promíchán a potom nanesen do dvou sterilních Petriho misek dřív, než médium opět ztuhlo.

3.3.2. Transformace *E. coli* DH5 α

E. coli DH5 α se používají pro amplifikaci plasmidu. Pro transformaci byly potřeba dvě sterilní mikrozkušavky. Do jedné z nich bylo pipetováno 30 μ l kompetentních buněk *E. coli* DH5 α a 1 μ l plasmidu (v našem případě pET-28a(+)/YddV-HD L65Q). Do druhé mikrozkušavky bylo pipetováno pouze 30 μ l buněk, nebyl přidán žádný plasmid a jednalo se tedy o kontrolní experiment. Obě mikrozkušavky byly poté nechány 45 minut na ledu a následně podrobeny teplotnímu šoku, kdy byly ponechány 70 sekund při teplotě 42 °C. Potom byly mikrozkušavky opět umístěny na led na 3 minuty. Po uplynutí dané doby bylo do mikrozkušavek napipetováno 300 μ l sterilního LB média a byly ponechány 1 hodinu při 37 °C (IR 1500 Automatic CO2 Incubator). Nakonec byly buňky naneseny na připravené agarové plotny s kanamycinem (viz kapitola 3.3.1.) a nechaly se opět inkubovat při 37 °C 18 hodin (IR 1500 Automatic CO2 Incubator).

3.3.3. Transformace *E. coli* BL12(DE3)

E. coli BL21(DE3) jsou využívány pro expresi proteinů. Při transformaci *E. coli* BL21(DE3) je postup téměř shodný s transformací kmenu DH5 α (viz kapitola 3.3.2.). Jediným rozdílem je délka teplotního šoku, kdy byly buňky *E. coli* BL21(DE3) ponechány v 42°C lázni jen po dobu 45 sekund.

3.3.4. Izolace plasmidu pET-28a(+)

3.3.4.1. Složení použitých roztoků

- GTE roztok
50 mM glukóza, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
- Lyzující pufr (vždy čerstvý)
0,2 M hydroxid sodný, 1% SDS (200 μ l 5 M hydroxid sodný, 4,3 ml voda, 500 μ l 10% SDS)
- Octan draselný
3M vzhledem k draselným iontům a 5M vzhledem k octanu, pH 4,8
- TE pufr
10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
- Polyethylenglykol (PEG) roztok
20% PEG, 2,5 M chlorid sodný

3.3.4.2. Postup izolace

Jednobuněčná kolonie transformované *E. coli* DH5 α (viz kapitola 3.3.2.) byla odebrána do 10 ml LB média s 10 μ l kanamycinu (60 μ g/ml) a inkubována 17 hodin při teplotě 37 °C a otáčkách 220 rpm (G24 Environmental Incubator Shaker). Po uplynutí inkubační doby bylo LB médium s buněčnými kulturami centrifugováno při 4500 rpm po dobu 3 minut (5415R) a peleta (buňky) přenesena do mikrozkušavky (objem 1,5 ml). Peleta byla resuspendována v 200 μ l vychlazeného GTE roztoku. Potom byl roztok ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo do mikrozkušavky přidáno 300 μ l lyzujícího pufru a obsah byl překlápěním opatrně promíchán a byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Po uplynutí inkubace bylo přidáno 200 μ l vychlazeného octanu draselného a opět byl obsah zkumavky promíchán překlápěním po dobu 10 sekund. Následně byl roztok inkubován 10 minut na ledu. Poté přišla na řadu centrifugace při 4 °C po dobu 10 minut při otáčkách 13200 rpm (Allegro X-22R) a

supernatant vzniklý po centrifugaci byl opatrně převeden do čisté mikrozkušavky (nesmí přijít do styku se sraženinou). K roztoku bylo přidáno 700 µl činidla fenol/chloroform/isopropylalkohol (25:24:1). Následně byla směs intenzivně třepána po dobu 3 minut a poté byla opět centrifugována při 13200 rpm a 4 °C 4 minuty (Allegro X-22R). Roztok nad peletou byl odebrán do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 700 µl isopropanolu. Poté byl roztok intenzivně třepán (1 minuta) a byl ponechán 10 minut na ledě, aby mohl precipitovat. Následně byl obsah centrifugován 10 minut při 13200 rpm a peleta byla poté opláchnuta v 500 µl 75% ethanolu chlazeného při -20°C a vysušena ve vakuové sušičce (10 minut, DNA SpeedVac DNA 110). Peleta byla rozpuštěna ve 100 µl TE pufru, byly přidány 2 µl RNasy A (1 mg/ml) a roztok byl inkubován po dobu 20 minut při 37 °C. Následně byl obsah přenesen do nové mikrozkušavky (objem 0,5 ml) a k obsahu ve zkumavce bylo potom přidáno 60 µl PEG roztoku a roztok ponechán se ledu po dobu 1 hodiny. Nakonec byl roztok centrifugován 15 minut při 13200 rpm a 4 °C (Allegro X-22R), byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta 170 µl vychlazeného 70% ethanolu, vysušena (DNA SpeedVac DNA 110) a rozpuštěna ve 20 µl sterilního TE pufru. Roztok plasmidu se uchovává při -20 °C.

Získaný roztok plasmidu byl charakterizován nejprve spektrofotometricky (NanoVue Plus). Byla zjištěna jeho absorbance při 260 nm (A_{260}) a při 280 nm (A_{280}). Je třeba roztok zředit tak, aby se absorbance pohybovala v intervalu od 0 do 1. Připravený roztok plasmidu byl zředěn 100x. Byl zjištěn poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm a vypočtena koncentrace plasmidu podle vztahu, kdy $A_{260} = 1$ odpovídá koncentraci 0,05 µg/µl.

Následně byla provedena elektroforéza DNA bez restrikční analýzy (viz kapitola 3.3.7.) a po provedení restrikční analýzy (viz kapitola 3.3.8.).

3.3.5. Kultivace bakterií a exprese proteinů

K 500 ml sterilního TB média (viz kapitola 3.2.2.3.) bylo přidáno 500 µl kanamycinu (60 mg/ml) a 500 µl inokulátu. Inokulát byl připraven přenesením jednobuněčné kolonie *E. coli* BL21(DE3) transformované plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q (viz kapitola 3.3.3.) do 5 ml LB média s 5 µl kanamycinu (60 mg/ml) a inkubací 17 hodin při teplotě 37 °C a otáčkách 220 rpm (G42 Environmental Incubator Shaker).

Po inokulaci bylo TB médium 5 hodin třepáno při teplotě 37°C a otáčkách 180 rpm (Orbi-Safe TS Net Wise). Zároveň byla sledována optická denzita buněk při 600 nm

(OD₆₀₀). Optimální hodnota OD₆₀₀ se pohybuje v rozmezí od 0,6 do 1,2. Jakmile bylo dosaženo hodnoty v tomto rozmezí, byla první fáze kultivace zastavena a byl odebrán vzorek směsi buněk (1,5 ml) na elektroforézu. Tento vzorek byl centrifugován a médium nad peletou bylo odstraněno. Buňky byly rozpuštěny ve 30 μ l destilované vody, bylo přidáno 10 μ l 4x koncentrovaného redukujícího pufru (0,25 M Tris/HCl, 8% SDS, 40% glycerol, 20% 2-merkaptoethanol, 0,012% bromfenolová modř, pH 6,5) a povařeny po dobu 5 minut.

Po této první fázi kultivace buněk bylo médium ponecháno 30 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 100 μ l IPTG (0,5 M), takže výsledná koncentrace IPTG v médiu byla 0,1 mM. Zároveň bylo přidáno 150 μ l δ -aminolevulové kyseliny (0,5 M), takže její výsledná koncentrace v médiu byla 0,15 mM. Po zahájení indukce exprese proteinu byla média třepána při teplotě 18°C, 150 rpm, 16 hodin (Orbi-Safe TS Net Wise). Exprese proteinu byla ukončena centrifugací po dobu 40 minut při 4 °C, 3000 rpm (Janetzki K70D) a sklizené buňky byly zváženy a uchovány při -80 °C pro další využití. Zároveň byl po ukončení exprese proteinu odebrán druhý vzorek směsi buněk na elektroforézu analogicky výše popsanému postupu odběru prvního vzorku. Opět bylo odebráno 1,5 ml suspenze a centrifugováno. Peleta byla rozpuštěna v 30 μ l vody. Nakonec bylo přidáno 10 μ l 4x koncentrovaného redukujícího pufru a roztok byl 5 minut povařen.

3.3.6. Elektroforéza SDS-PAGE

3.3.6.1. Složení použitých pufrů a roztoků

- Pufr A
0,375 M Tris/HCl, 0,1% SDS (w/v), pH 8,8
- Polymerační roztok A
30% akrylamid (w/v), 0,8% BIS (w/v) ve 100 ml pufru A
- Pufr B
0,125 M Tris/HCl, 0,1% SDS (w/v), pH 6,8
- Polymerační roztok B
30% akrylamid (w/v), 0,8% BIS (w/v) ve 100 ml pufru B

- Elektrodový pufr
0,025 M Tris/HCl, 0,192 M glycin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,3
- Barvicí lázeň
0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 46% ethanol (v/v), 9,2% kyselina octová (v/v)
- Odbarvovací lázeň
25% ethanol (v/v), 10% kyselina octová (v/v)

3.3.6.2. Postup provedení elektroforézy

Nejprve byla odmaštěna a sestavena aparatura. Poté byl připraven 15% rozdělovací gel smícháním 3,5 ml pufru A, 3,5 ml polymeračního roztoku A, 7 μ l TEMEDu a 70 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Polymerační směs byla nalita mezi skla aparatury (miniVE Vertical) a převrstvena vodou, která chránila polymerační roztok před vzdušným kyslíkem, aby mohla polymerovat. Tento proces trval 20 minut a poté byla voda odstraněna.

Následně byl připraven 4% gel (zaostřovací) smícháním 2,6 ml pufru B, 400 μ l polymeračního roztoku B, 3 μ l TEMEDu a 60 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Polymerační směs byla poté nanесena na 15% gel a do ní byl vložen 10-jamkový hřeben.

Po 20 minutách byla směs již zpolymerována a hřeben byl vyjmut. Byl otevřen spodní díl aparatury a ta byla poté umístěna do vany naplněné elektrodoým pufrem. Elektrodový pufr byl také nanесen do jamkového prostoru a do jamek byly následně aplikovány Hamiltonovou injekční stříkačkou 3 μ l vzorků a standardu (složení vzorků viz kapitola 3.3.5.).

Po nanесení vzorků bylo na elektrody vloženo napětí 80 V po dobu 20 minut (aby se zóny vzorků mohly zaostřit ve 4% gelu). Poté bylo napětí změněno na 110 V, při kterých probíhala elektroforéza další 2,5 hodiny.

Po ukončení elektroforézy byl rozdělovací gel přemístěn do barvicí lázně. Tam se barvil 1 hodinu za stálého míchání a následně byla barvicí lázeň vyměněna za odbarvovací, kde se gel odbarvoval 16 hodin.

3.3.7. Elektroforéza DNA

Gel pro elektroforézu DNA byl připraven přidáním agarosy do 40 ml TAE pufru (0,04 M Tris/Acetát, 1 mM EDTA, pH 8,2) tak, aby výsledně vznikl 1% (w/v) roztok agarosy. Agarosa byla pomalu rozpouštěna v mikrovlnné troubě za občasného míchání. Po vychladnutí roztoku agarosy byly do něj přidány 4 μ l barviva SYBRTM Safe DNA gel Stain (1000x ředěno). Poté byl polymerační roztok nalit do formy a byl v něm upevněn hřeben na 10 jamek.

Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini), naplněné TAE pufrem a do jamek byly aplikovány vzorky obsahující vzorkový pufr (40% sacharosa, 91% bromfenolová modř). Vzorky 10x ředěného zásobního roztoku plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q měly objem 8 μ l a k nim byly přidány 2 μ l vzorkovacího pufru. Poté bylo na elektrody vloženo napětí 86 V. Elektroforéza byla provedena analogicky k předchozím pracím³⁶.

Po ukončení elektroforézy byl gel vizualizován UV zářením v temné komoře a výsledek zaznamenán.

3.3.8. Restrikční analýza

Restrikční analýza byla provedena smícháním 1 μ l plasmidové DNA s 0,5 μ l endonukleasy Nde I, 0,5 μ l endonukleasy EcoRI, 1 μ l NEB pufru číslo 4 (50mM octan draselný, 20mM Tris/acetát, 10mM octan hořečnatý, 1mM dithiothreitol, pH 7,9)³⁷ a 7 μ l sterilní vody. Roztoky byly napipetovány do mikrozkušavky a inkubovány 2 hodiny při 37 °C (IR 1500 Automatic CO2 Incubator). Poté byly přidány 2 μ l vzorkovacího pufru (40% sacharosa, 91% bromfenolová modř) a byla provedena elektroforéza DNA fragmentů (viz kapitola 3.3.7.).

4. Výsledky

4.1. Izolace a charakterizace plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q

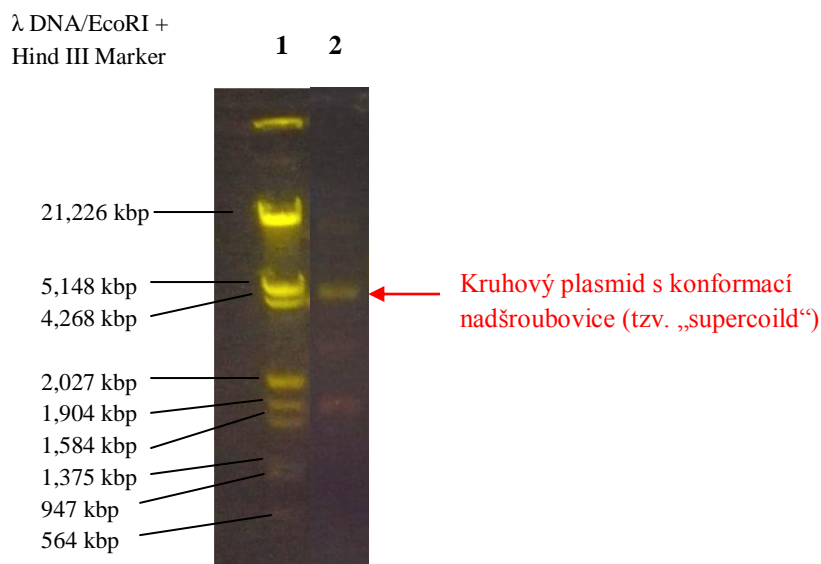
Izolací bylo získáno 20 μl roztoku plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q v TE pufru. Hodnoty absorbance jsou uvedeny v tabulce číslo 1. Koncentrace 100x ředěného roztoku plasmidu byla stanovena na 0,006 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. To znamená, že koncentrace námi připraveného roztoku byla rovna 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Celkem tedy bylo získáno 12 μg plasmidu v celkovém objemu 20 μl . Toto množství izolovaného plasmidu je nižší, než obvyklý výtěžek izolace plasmidové DNA, tedy 350 μg – 1 mg ze 100 ml kultury³⁸. Z toho plyne, že v našem případě, kdy z 10 ml kultury bylo získáno 12 μg , bychom ze 100 ml kultury získali 120 μg .

Také byl zjištěn poměr A_{260} a A_{280} , což je údaj, který vypovídá o čistotě preparátu a eventuální přítomnosti balastních proteinů. V našem případě byl poměr A_{260} a A_{280} roven 4,8 (viz Tab. 1).

Tab. 1 Spektrofotometrická analýza izolovaného plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q. Ze zjištěné koncentrace vyplývá, že celkový výtěžek plasmidu je 12 μg ve 20 μl roztoku.

	Před ředěním	Po ředění 100x TE purem	$c_g[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$	m_{plasmidu} v 20 μl [μg]
A_{260}	22,120	0,162		
$A_{260/280}$	1,922	4,800	0,6	12
A_{280}	11,509	0,034		

Plasmid byl podroben elektroforéze na agarosovém gelu (viz Obr. 8). V dráze jedna je vidět výsledek dělení lineárních fragmentů DNA přítomných v markeru „ λ DNA/EcoRI + Hind III Marker“. Do dráhy dvě byl aplikován 10x ředěný (viz kapitola 3.3.7.) roztok námi amplifikovaného plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q.



Obr. 8 Analýza izolované plasmidové DNA (*pET-28a(+)/YddV-HD L65Q*) pomocí elektroforézy na 1% agarosovém gelu.

1. Marker „ λ DNA/EcoRI + Hind III Marker“ s vyznačenými referenčními fragmenty lineární DNA o známé velikosti (bp)
2. 10x ředěný kruhový plasmid *pET-28a(+)/YddV-HD L65Q*

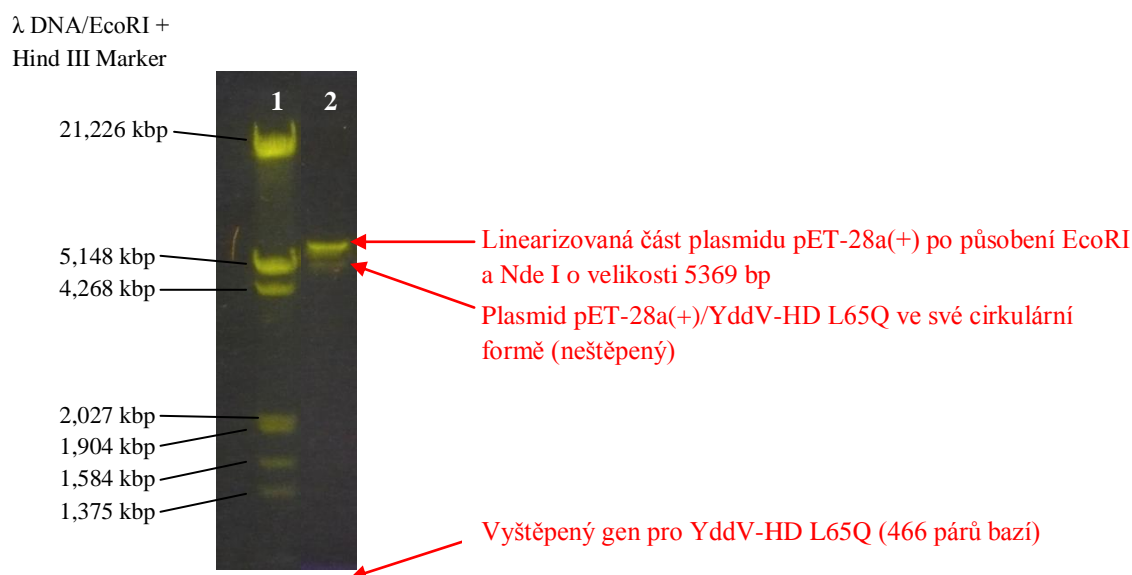
Na obrázku číslo 8 není patrná žádná nečistota v podobě RNA, tedy žádný signál na spodní části gelu, který by odpovídal balastní RNA a ani žádný signál v horní části gelu, který by nasvědčoval znečištění genomovou DNA *E. coli*. Výsledkem této elektroforetické analýzy je jeden majoritní fragment s mobilitou odpovídající přibližně 5000 bp lineárního úseku DNA. Dále jsou na agarosovém gelu patrné 3 minoritní frakce s mobilitou přibližně 1500, 3000 a 10000 bp. Majoritní fragment bude pravděpodobně představovat kruhový plasmid s kompaktní konformační strukturou (tzv. „supercoiled“), jehož velikost se pohybuje kolem velikosti stejně velkého, avšak lineárního úseku DNA, a to přibližně 5000 bp.

Další metodou charakterizace izolovaného plasmidu *pET-28a(+)/YddV-HD L65Q* byla restrikční analýza. Tato analýza byla také zakončena elektroforézou na agarosovém gelu (viz kapitola 3.3.7.). Výsledek této analýzy je zobrazen na obrázku číslo 9.

V dráze jedna je výsledek dělení DNA fragmentů obsažených v markeru „ λ DNA/EcoRI + Hind III Marker“, zatímco do dráhy dvě byl aplikován vzorek plasmidu *pET-28a(+)/YddV-HD L65Q* po restrikční analýze (viz kapitola 3.3.8.). Je patrná majoritní frakce části plasmidu vzniklá štěpením restrikčními endonukleasami EcoRI a Nde I. Tato frakce má velikost přibližně 5400 bp. Vzhledem k tomu, že působení endonukleas EcoRI a Nde I mělo za následek vyštěpení genu pro YddV-HD L65Q o velikosti 466 bp, velikost

tohoto pozorovaného fragmentu odpovídá skutečnosti (tj. 5369 bp). Vyštěpení genu pro YddV-HD L65Q tedy proběhlo pravděpodobně úspěšně. Dále je patrná minoritní frakce o mobilitě odpovídající přibližně 5000 bp. Pravděpodobně se jedná o malou frakci plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q, která nebyla účinkem endonukleas štěpena. Jedná se patrně o stejnou frakci, která je majoritní frakcí na předchozím obrázku (viz Obr. 8), tedy agarosovém gelu před restrikční analýzou. V tomto případě je DNA kruhová (cirkulární) a v prostoru zaujímá nadšroubovicovou kompaktní strukturu. Mobilita takového uspořádání je větší, než by odpovídalo počtu párů bází. Na gelu není pozorovatelná frakce odpovídající vyštěpenému genu pro YddV-HD L65Q (velikost 466 bp), jelikož elektroforéza byla bohužel ukončena příliš pozdě a signál odpovídající této frakci na obrázku číslo 9 není detekovatelný.

Vzhledem k tomu, že je signál majoritní frakce (část plasmidu pET-28a(+)) o velikosti 5369 bp) tak silný, je pravděpodobné, že by stejnou intenzitu měla mít i frakce vyštěpeného genu YddV-HD L65Q o velikosti 466 bp. Můžeme tedy předpokládat, že restrikční analýza proběhla úspěšně a analyzovaný plasmid je skutečně pET-28a(+)/YddV-HD L65Q.



Obr. 9 Restrikční analýzy plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q štěpeného restrikčními endonukleasami EcoRI a Nde I (elektroforéza fragmentů na 1% agarosovém gelu).

1. Marker „λ DNA/EcoRI + Hind III Marker“ s vyznačenými referenčními fragmenty DNA o známé velikosti (bp)
2. Plasmid pET-28a(+)/YddV-HD L65Q po působení restrikčními endonukleasami EcoRI a Nde I

4.2. Transformace *E. coli* BL21(DE3) plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q

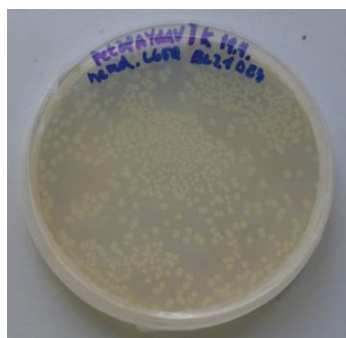
Jak je vidět na obrázcích číslo 10a a 10b, transformace buněk *E. coli* BL21(DE3) plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q proběhla úspěšně. Na agarové plotně s kanamycinem, na níž byla nanesena kontrolní směs (žádným plasmidem netransformované *E. coli* BL21(DE3)) skutečně žádná kolonie nevyrostla (viz obrázek 10a). To znamená, že buňky *E. coli* BL21(DE3) nebyly kontaminované jiným plasmidem a celý transformační experiment tedy nebyl znehodnocen.

Na agarové plotně, na kterou byly naneseny transformované bakterie (viz obrázek 10b), je patrných přibližně 200 jednotlivých jednobuněčných kolonií. Pro expresi proteinu YddV-HD L65Q byla vybrána izolovaná kolonie průměrné velikosti ze středu plotny.

V souladu s předpokladem, že před indukcí pomocí IPTG bakterie neexprimují požadovaný protein (YddV-HD L65Q) bylo pozorováno, že tyto bakterie na agarových plotnách mají bílou barvu, a tudíž neexprimují YddV-HD L65Q. Ten je totiž hnědočerveně zbarven v důsledku koordinace hemu na tento protein a jeho přítomnost by byla patrná.



Obr. 10a Kontrolní agarová plotna s buňkami *E. coli* BL21(DE3) bez transformace.



Obr. 10b Agarová plotna s buňkami *E. coli* BL21(DE3) transformovanými plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q.

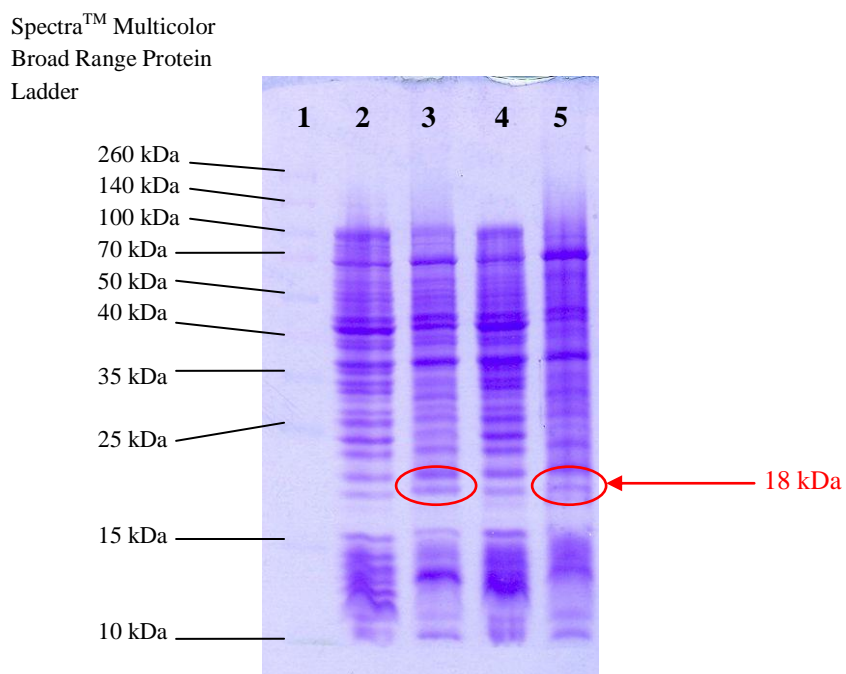
4.3. Exprese YddV-HD L65Q v *E. coli* BL21(DE3)

Před indukcí exprese požadovaného proteinu YddV-HD L65Q se OD₆₀₀ kultivovaných buněk rovnala 0,929 (po 5 hodinách kultivace při 37 °C a 180 rpm). Po indukcí pomocí IPTG se protein exprimoval 16 hodin (18 °C, 150 rpm, detailní postup viz kapitola 3.3.5.). Výsledně jsme získali 31,8 g buněk z *E. coli* BL21(DE3) s exprimovaným proteinem YddV-HD L65Q ze 4 l TB média. Výtěžkem je tedy 7,95 g buněk z každého litru TB média.

Na obrázku číslo 11 je vyobrazena kontrola exprese proteinů YddV-HD L65Q a YddV-HD wt buňkami *E. coli* BL21(DE3) pomocí elektroforézy v 15% gelu. V dráze číslo dvě a čtyři jsou příslušné buňky *E. coli* BL21(DE3) před indukcí pomocí IPTG a tedy ještě neexprimují daný protein. V dráze číslo tři a pět jsou příslušné buňky *E. coli* BL21(DE3) exprimující daný protein (tj. YddV-HD L65Q a YddV-HD wt) po indukcí pomocí IPTG. V dráze jedna jsou vidět proteinové fragmenty o známých velikostech obsažené v markeru „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“.

Velikost YddV-HD L65Q i YddV-HD wt je podle aminokyselinové sekvence 18 kDa. V drahách číslo tři a pět, kam byly aplikovány vzorky buněk *E. coli* BL21(DE3) transformovaných plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q, respektive pET-28a(+)/YddV-HD wt po indukcí IPTG, je v oblasti odpovídající velikosti 18 kDa patrný signál, který je intenzivnější, než v drahách číslo dvě a čtyři, kam byly aplikovány analogické vzorky před indukcí. Navíc je patrné, že intenzita signálu odpovídající 18 kDa je v případě dráhy tři (odpovídající expresi YddV-HD L65Q) silnější, než u dráhy pět (odpovídající expresi YddV-HD wt).

Dá se předpokládat, že tato změna intenzity signálu je způsobena expresí požadovaného proteinu po indukce IPTG a z toho lze usoudit, že indukce exprese YddV-HD L65Q proběhla úspěšně. Je však patrné, že míra exprese YddV-HD, ať už se jedná o mutantní protein, nebo o protein ve své přirozené podobě, je oproti jiným proteinům exprimovaným v *E. coli* BL21(DE3) poměrně malá.



Obr. 11 Kontrola exprese proteinů *YddV-HD L65Q* a *YddV-HD wt* buňkami *E. coli BL21(DE3)* pomocí SDS elektroforézy v 15% gelu.

1. Marker „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ s vyznačenými referenčními proteiny o známé molekulové hmotnosti
2. Vzorek buněk *E. coli BL21(DE3)* transformovaných plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q před indukcí IPTG
3. Vzorek buněk *E. coli BL21(DE3)* transformovaných plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q po indukcí IPTG
4. Vzorek buněk *E. coli BL21(DE3)* transformovaných plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD wt před indukcí IPTG
5. Vzorek buněk *E. coli BL21(DE3)* transformovaných plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD wt po indukcí IPTG

5. Diskuze

Kyslík detekující protein YddV byl již zkoumán jinými vědci dříve. Byly provedeny studie jak s celým proteinem, tak i s jeho jednotlivými doménami^{30,32}. Stále ale není znám mechanismus přenosu signálu mezi sensorovou doménou a funkční doménou a některé další aspekty jeho fungování. Z této skutečnosti vyplývá, že je potřeba provést další studie. Část výzkumu se aktuálně zaměřuje na spektroskopickou analýzu struktury sensorové domény v oblasti kyslík vázajícího detekčního místa. Především infračervená spektroskopie a rezonanční Ramanova spektroskopie by mohla v tomto ohledu přinést unikátní data. To by mohlo pomoci odhalit mechanismus signalizace. Nejdříve však potřebujeme efektivní systém produkce dostatečného množství studovaného proteinu.

Vzhledem k velké flexibilitě hem obsahujících sensorových proteinů, kdy se samotné domény mohou nacházet ve velkém množství různých konformací a v ještě větším počtu vzájemných poloh, je nutné přistupovat ke studiu takovýchto složitých flexibilních proteinů různými cestami². Jednou z nich je studium sensorových a funkčních domén separátně a poté generalizace získaných poznatků³¹. Zatímco druhá cesta využívá studia modelových bakteriálních systémů²⁷. V případě našich studií byly použity a kombinovány oba možné přístupy.

Cílem této práce bylo ověření možnosti efektivní produkce různých mutantních forem proteinu YddV v bakteriálním expresním systému. Konkrétně se jednalo o protein YddV-HD L65Q, který na pozici 65 místo Leu obsahuje Gln. Z předchozích studií vyplývá, že přítomnost Leu je nezbytně nutná pro ochranu sensorové domény před autooxidací způsobenou molekulou kyslíku, kterou protein YddV detekuje³⁰. Kromě funkce ⁶⁵Leu je ještě známá funkce další aminokyseliny na distální straně hemu proteinu YddV a to ⁴³Tyr (cit. ^{30,32}). Tento tyrosin stabilizuje koordinaci kyslíku na komplex hemu YddV³².

Namnožili a izolovali jsme plasmid pET-28a(+)/YddV-HD L65Q ve vysoké čistotě. To bylo potvrzeno jednak spektrofotometrickou analýzou a také analýzou elektroforetickou.

Spektrofotometrickou kvantifikací izolovaného plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q byla zjištěna hmotnost toho plasmidu ve 20 μ l TE pufru. Ukázalo se, že množství námi izolovaného plasmidu je nižší, než je obvykle očekáváno v případě izolace plasmidové DNA z bakteriálních kultur³⁸. Navíc, poměr A_{260} a A_{280} v případě ředěného vzorku byl velmi vysoký, což by pravděpodobně svědčilo o vysokém stupni kontaminace

roztoku plasmidu v podobě RNA. Vzhledem k tomu, že ale poměr A_{260} a A_{280} v případě neředěného vzorku i elektroforéza na agarosovém gelu (viz dále) vypovídají o vysoké čistotě námi izolovaného plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q, můžeme soudit, že se jedná o chybu zaviněnou nepřesným měřením spektrofotometru NanoVue Plus.

Dále byla provedena analýza elektroforetická. Jak je vidět na agarosovém gelu na obrázku číslo 8 (kapitola 4.1.), roztok námi izolovaného plasmidu neobsahoval žádné viditelné nečistoty v podobě genomové DNA *E. coli*, která by se nacházela v horní části gelu, ani v podobě balastní RNA, která by se naopak vyskytovala v dolní části gelu. Plasmid, který nebyl podroben štěpení restričními endonukleasami, zůstává majoritně ve své kruhové formě. Navíc se může nacházet v několika různých konformačních stavech, které mají různou mobilitu v gelu³⁶. Vzhledem k tomu, že na obrázku číslo 8 se nad ani pod oblastí majoritního signálu nenachází žádný minoritní signál, který by svědčil o přítomnosti plasmidu v relaxované, nebo dokonce lineární podobě, můžeme usoudit, že plasmid pET-28a(+)/YddV-HD L65Q se nachází převážně v nadšroubovicovém (tzv. supercoiled“) stavu.

Po restriční analýze plasmidu pET-28a(+)/YddV-HD L65Q (viz Obr. 9 v kapitole 4.2.) jsou na následné agarosové elektroforéze zřetelné dvě frakce. Majoritní frakce značí přítomnost lineárního fragmentu plasmidu pET-28a(+) po štěpení neseného genu YddV-HD L65Q. Minoritní frakce reprezentuje plasmid pET-28a(+)/YddV-HD L65Q, který nebyl účinkem endonukleas štěpen. Jedná se patrně o stejnou frakci, která je majoritní frakcí na předchozím obrázku (viz Obr. 8), tedy agarosovém gelu před restriční analýzou. Frakce, která by reprezentovala přítomnost vyštěpeného genu pro YddV-HD L65Q chybí v důsledku včasného neukončení elektroforézy DNA. Nicméně, vzhledem k tomu, že mobilita lineárního fragmentu plasmidu pET-28a(+) odpovídá jeho skutečné velikosti (5369 bp), je pravděpodobné, že byl restričními endonukleasami štěpen a při včasném zastavení elektroforézy by byla viditelná druhá majoritní frakce o mobilitě odpovídající velikosti 466 bp, tedy odpovídající přítomnosti vyštěpeného genu pro YddV-HD L65Q.

Provedením elektroforézy buněk *E. coli* BL21(DE3) transformovaných plasmidem pET-28a(+)/YddV-HD L65Q (viz Obr. 11, kapitola 4.3.) bylo zjištěno, že protein YddV-HD L65Q byl opravdu exprimován po indukci pomocí IPTG. Nicméně míra této exprese je velmi nízká. Tento fakt je v souladu se studiemi jiných hem obsahujících senzorových proteinů, ve kterých bylo prokázáno, že míra exprese těchto proteinů je velmi nízká (např. HRI)¹¹. Na druhou stranu, existují výjimečně také hem obsahující senzorové proteiny, jejichž míra exprese je o několik řádů vyšší (např. AfGcHK)²⁷.

6. Závěr

Cíle bakalářské práce byly splněny.

1. Na stranách 12-27 je vypracován souhrn dosavadních poznatků z oblasti hem obsahujících senzorových proteinů se zvláštním zřetelem na kyslík detekující proteiny.
2. Amplifikovali a izolovali jsme plasmid pET-28a(+)/YddV-HD L65Q. Získali jsme celkové množství 12 µg ve 20 µl TE pufru. Navíc jsme zkontrolovali pomocí prosté elektroforézy a elektroforézy po restrikční analýze, že se skutečně jedná o požadovaný plasmid.
3. Funkčnost daného plasmidu jsme ověřili při expresi genu YddV-HD L65Q v buňkách *E. coli* BL21(DE3). Celkově jsme získali 31,8 g buněk. Přítomnost exprimovaného plasmidu byla ověřena elektroforézou.

Použitá literatura

1. Awad, W. M., Jr.: Iron and Heme Metabolism v knize *Textbook of Biochemistry with Clinical correlations*, str. 823-847 (2006)
2. Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Shimizu T.: Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-sensing Site: Heme-sensing and Gas-sensing Proteins v knize *Handbook of Porphyrin Science*, Vol. 15, str. 339-460 (2011)
3. Poulos, T. L.: *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 504-510 (2007)
4. Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Matinkova, M.; Murase, M.; Iizuka, A.; Shimizu, T.: *Acta. Chim. Slov.*, **55**, 67-74 (2008)
5. Martínková, M.: osobní sdělení
6. Shimizu T.: *J. Inorg. Biochem.*, **108**, 171-177 (2012)
7. Kitanishi, K.; Igarashi, J.; Hayasaka, K.; Hikage, N.; Saiful, I.; Yamauchi, S.; Uchida, T.; Ishimori, K.; Shimizu, T.: *Biochemistry*, **47**, 6157-6168 (2008)
8. Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichlerri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 18782-18791 (2008)
9. McEwen, E.; Kedersha N.; Song B.; Scheuner D.; Gilks N.; Han, A; Chen J.; Anderson, P; Kaufman, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 16925-16933 (2005)
10. Igarashi, J.; Sato, A.; Kitagawa, T.; Yoshimura, T.; Yamauchi, S.; Sagami, I.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 15752-15762 (2004)
11. Miksanova, M.; Igarashi, J.; Minami, M.; Sagami, I.; Yamauchi, S.; Kurokawa, H.; Shimizu, T.: *Biochemistry*, **45**, 9894-9905 (2006)
12. Greenman, Ch.; Stephens, P.; Smith, R.; Dalgliesh, G. L.; Hunter, Ch.; Bignell, G.; Davies, H.; Teague, J.; Butler, A.; Stevens, C.; et al.: *Nature*, **446**, 153-158 (2007)
13. Shan, Y.; Lambrecht, R. W.; Ghaziani, T.; Donohue, S. E.; Bonkovsky, H. L.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 51769-51774 (2004)
14. Hintze, K. J.; Katoh, Y.; Igarashi, K.; Thell, E. C.: *J. Biol. Chem.*, **282**, 34365-34371 (2007)
15. Hira, S.; Tomita, T.; Matsui, T.; Igarashi, K.; Ikeda-Saito, M.: *IUBMB Life*, **59**, 542-551 (2007)

16. Gupta, R.; Sharma, S.; Sommers, J. A.; Jin, Z.; Cantor, S. B.; Brosh, R. M., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 25450-25460 (2005)
17. Dioum, E.; Rutter, J.; Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.; McKnight, S. L.: *Science*, **298**, 2385-2387 (2002)
18. Uchida, T.; Sato, E.; Sato, A.; Sagami, I.; Shimizu, T.; Kitagawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 21358-21368 (2005)
19. Yang, J.; Kim, K. D.; Lucas, A.; Drahos, K. E.; Santos, C. S.; Mury, S. P.; Capelluto, D. G. S.; Finkielstein, C. V.: *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 4697-4711 (2008)
20. Kabil, O.; Banerjee, R.: *J. Biol. Chem.*, **285**, 21903-21907 (2010)
21. Jain, R.; Chan, M. K.: *J. Biol. Inorg. Chem.*, **8**, 1-11 (2003)
22. Gilles-Gonzalez, M.; Gonzalez, G.: *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1-22 (2005)
23. Monson, E. K.; Ditta, G. S.; Helinski, D. R.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 5243-5250 (1995)
24. Miyatake, H.; Mukai, M.; Adachi, S.; Nakamura, H.; Tamura, K.; Iizuka, T.; Shiro, Y.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 23176-23184 (1999)
25. He, Y.; Gaal, T.; Karls, R.; Donohue T. J.; Gourse R. L.; Roberts G. P.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 10840-10845 (1999)
26. Shelver, D.; Kerby, R. L.; He, Y.; Roberts G. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 11216-11220 (1997)
27. Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Uchida, T.; Ishimori, K.; Igarashi, J.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 35522-35534 (2011)
28. Balashova N.; Chang F.; Lamothe M.; Sun Q.; Bueve A.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 2186-2196 (2005)
29. Sharina I. G.; Jelen F.; Bogatenkova E. P.; Thomas, A.; Martin, E.; Murad, F.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 15104-15113 (2008)
30. Nakajima, K.; Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Kobayashi, N.; Igarashi, J.; Shimizu, T.: *J. Inorg. Biochem.*, **180**, 163-170 (2012)
31. Zhang, W.; and Phillips, G. N. Jr.: *Structure*, **11**, 1097-1110 (2003)

32. Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Kawamura, Y.; Ishigami, I.; Ogura, T.; Nakajima, K.; Igarashi, J.; Tanaka, A.; Shimizu, T.: *Biochemistry*, **49**, 10381-10393 (2010)
33. Méndez-Ortiz, M. M.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Membrillo-Hernández, J.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 8090-8099 (2006)
34. Tagliabue, L.; Antoniani, D.; Maciag, A.; Bocci, P.; Raffaelli N.; Landini, P.: *Microbiology*, **156**, 2901-2911 (2010)
35. Novagen, katalog: http://www.emdmillipore.com/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab (převzato ke dni 5. května 2012)
36. Milichovský, J.: Heterologní exprese a izolace lidských isoform cytochromů P450 1A1/2; Kandidátská diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 47-48 (2011)
37. New England Biolabs: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productb7004.asp> (katalog, převzato ke dni 10. května 2012)
38. Buckingham, L.: Nucleic Acid Extraction Methods v knize *Molecular Diagnostics – Fundamentals, Methods and Clinical Applications*, str. 65-79 (2007)